

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

VALEUR PRATIQUE DE LA « TECHNIQUE CINÉTIQUE » DE SÉRO-NEUTRALISATION POUR LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA POLIOMYÉLITE

par P. LÉPINE, F. ROGER et M^{me} A. ROGER (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus)

L'isolement de la souche ou la recherche des anticorps spécifiques constituent les deux moyens principaux d'identification d'une infection au laboratoire et la poliomyélite ne fait pas exception à cette règle.

Le diagnostic étiologique de cette maladie est cependant resté très difficile et très coûteux jusqu'à l'introduction des cultures cellulaires par Enders, Weller et Robbins.

Les cellules de première explantation (cellules de rein de singe) ou les cellules de souche d'origine humaine (cellules HeLa ou KB) ont, en effet, permis par leur grande sensibilité l'isolement de souches nombreuses à partir des selles.

En même temps, les titres virulents élevés obtenus lors des cultures *in vitro* (et qui permettent, par ailleurs, la fabrication des vaccins) semblaient aussi conduire tout naturellement à la préparation d'antigènes utilisables en *fixation du complément*.

Enfin, les propriétés cytopathogènes des virus poliomyélictiques, spécifiquement neutralisables *in vitro* par les anticorps

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} mars 1960.

rendaient possible une identification précise des virus isolés (*typage*), ou des anticorps sériques homologues (*séro-neutralisation*).

Malgré ces perfectionnements spectaculaires, le diagnostic de la poliomyélite est demeuré l'apanage de laboratoires spécialisés assez peu nombreux et tout à fait incapables, par leur petit nombre même, de répondre aux nécessités du praticien.

Cette situation provisoire n'est pas sans rappeler celle de la bactériologie à ses débuts et doit trouver logiquement un terme dans une plus grande diffusion des techniques sérologiques, c'est-à-dire dans une extension de leur enseignement, mais aussi dans un effort de simplification préalable qui doit être fourni par les laboratoires spécialisés.

Avec la poliomyélite ce sont, en effet, surtout des *difficultés d'ordre pratique* qui ont empêché l'utilisation des procédés de diagnostic par les laboratoires d'analyses médicales.

La réaction de *fixation du complément*, par exemple, bien que familière dans son principe à tous les laboratoires de sérologie, est encore assez délicate et n'a guère dépassé le stade expérimental avec la poliomyélite en raison des difficultés rencontrées lors de la préparation des antigènes.

L'*isolement de la souche* est long et d'un assez faible rendement par suite des trois étapes successives qu'on est obligé de parcourir : le traitement préalable des prélèvements (qui ne doivent être ni contaminés ni cytotoxiques), l'isolement proprement dit et la caractérisation du virus isolé enfin (par typage en présence des antisérums de référence).

La réaction de *séro-neutralisation* est moins complexe que l'isolement dans son principe, puisqu'elle procède directement à la caractérisation des anticorps sériques en présence de virus de référence et peut donc être faite en un seul temps. Pendant longtemps, elle a pourtant été assez peu commode dans la pratique par suite de modalités techniques passablement complexes et qui la rendaient tout à fait inutilisable pour un travail poursuivi sur une grande échelle. Elle se heurtait aussi à une objection de principe née de la longue persistance des anticorps neutralisants dans l'organisme ; on la considérait de ce fait comme un excellent test *rétrospectif* de l'infection virale, d'une grande valeur épidémiologique certes, mais tout à fait incapable de préciser avec certitude le caractère *récent* ou non du contact avec le virus.

La mise au point au Service des Virus de l'Institut Pasteur d'un procédé simple et précis, utilisable sur une grande échelle pour des buts expérimentaux ou pour des enquêtes, faisait disparaître l'obstacle technique majeur rencontré par les réactions de séro-neutralisation [2].

Aussi avons-nous été conduits à nous demander si une étude plus attentive des anticorps neutralisants et de leur titre chez les individus sains ou atteints de poliomyélite ne parviendrait pas à dégager des critères d'utilisation valables pour le diagnostic, compte tenu de la date éventuelle de la maladie, et nous avons rapporté déjà les résultats préliminaires particulièrement favorables qui ont ainsi été obtenus [5].

Nous avons décrit précédemment la « technique cinétique » utilisée [2, 4] et précisé aussi ce que le médecin était en droit d'attendre des réactions de séro-neutralisation, leurs indications, leurs conditions d'interprétation et leurs limites [3]; nous n'y reviendrons donc pas ici.

Le présent article se propose, en effet, d'exposer simplement comment nous avons pu dégager *les règles pratiques* d'utilisation, afin que chacun puisse se faire une idée de la valeur de nos critères, et de donner un exemple de ce que l'on peut légitimement attendre d'un laboratoire de diagnostic de la poliomyélite, basé essentiellement sur les réactions de séro-neutralisation, en rapportant les résultats d'un laboratoire-pilote que nous avons établi et qui a fonctionné sans discontinuer pendant plusieurs mois.

I. — LES ÉTAPES SUCCESSIVES D'ÉTALONNAGE DE LA RÉACTION.

Avant de parvenir à une opinion valable sur les réactions de séro-neutralisation et leur utilisation pour le diagnostic, nous sommes passés par trois étapes successives : une étape de confrontation des résultats sérologiques avec les données de la clinique ; une étape de comparaison entre les résultats sérologiques et ceux obtenus par l'isolement de la souche ; une dernière étape enfin, d'utilisation systématique de la séro-neutralisation ainsi étalonnée pour le diagnostic de routine au laboratoire.

A. PREMIÈRE ÉTAPE : « CLINICO-SÉROLOGIQUE ». — L'étude préliminaire s'est étendue sur cinq mois, de mars à juillet 1959.

Nous avons étudié pendant cette période 540 prélèvements par la réaction quantitative de séro-neutralisation : ils correspondaient à 325 individus (225 malades atteints d'infections méningées ou paralysantes d'origine poliomyélitique possible ou vraisemblable, et 100 individus normaux pris pour témoins et provenant tous du Centre de Vaccination Antipoliomyélitique de l'Hôpital Pasteur).

L'analyse détaillée des cas individuels sérologiques comparés à la date des prélèvements par rapport à une éventuelle maladie nous a conduits à des critères provisoires valables pour les

TABLEAU I.

	Prélèvements	I	II	III	Diagnostic clinique	Etiquette sérologique "provisoire"
Variations	Variations non significatives	n° 1 320 n° 2 640	160 160	640 320	Individu normal contrôlé à 1 mois de distance 1 an après rappel de vaccin.	Exclusion
	Variation significative (x 4)	n° 1 80 n° 2 640	0 0	320 320	Poliomyélite typique (paraplégie)	Type I
	Variation significative (x 4)	n° 1 0 n° 2 0	0 0	20 160	Poliomyélite paralytique (nourrisson de 3 mois)	Type III
Pas de variations	Triple-négatif	n° 1 0 n° 2 0	0 0	0 0	Enfant de 1 an, non vacciné, bien portant	Exclusion de tout contact antérieur.
	Niveau bas	n° 1 80 n° 2 80	40 80	20 10	Adulte de 40 ans sans rien de particulier	Contact ancien 3 types.
	Niveau moyen sérologiquement douteux (1ère possibilité)	n° 1 320 n° 2 320	0 0	20 20	Adulte de 30 ans jamais malade	Contact ancien probable I et III.
	Niveau moyen sérologiquement douteux (2ème possibilité)	n° 1 160 n° 2 80	80 40	320 320	Monoplégie typique 5 ans	III probable
	Niveau élevé significatif	n° 1 640 n° 2 1280	20 10	80 160	Paralysie des 2 membres inférieurs. Paralysie faciale droite. (3 ans)	I probable
	Niveau très élevé (1ère possibilité).	n° 1 10240 n° 2 10240	320 640	1280 640	Paralysie du deltoïde doit. (27 ans)	I probable
	Niveau très élevé (2ème possibilité)	n° 1 10240 n° 2 5120	640 1280	160 160	Individu normal. L'enquête permet de trouver un rappel de vaccin 3 mois avant.	Effet de rappel

sujets ayant acquis activement des anticorps par contact avec le virus (voir ailleurs l'évolution des anticorps consécutifs à la vaccination [4] dont il faudra toujours tenir compte dans l'interprétation des résultats et l'évolution des anticorps transmis passivement [1]).

Ces *critères provisoires* sont les suivants (voir tableau I).

1° *La variation du titre* des anticorps avec la technique cinétique de séro-neutralisation n'est significative que si elle s'effectue dans un rapport de 1 à 4 : une variation du simple au double peut en effet se produire dans un même protocole ou d'un protocole à l'autre avec un même échantillon de sérum.

2° *Le niveau des anticorps* par lui-même peut être intéressant, même sans variation de titre :

a) Un titre inférieur à 10 exclut tout contact antérieur avec le virus.

b) Un titre égal ou inférieur à 160 établit l'existence d'un contact presque toujours ancien avec le virus (cliniquement apparent ou non).

c) Un titre de 640 et plus suggère un contact récent et primaire avec le virus.

Le titre de 320 est douteux et peut être rencontré avec des sérums appartenant aux deux précédentes catégories (contact relativement ancien ou contact récent mais sans élévation considérable du titre des anticorps).

d) Lorsque les titres obtenus sont élevés contre plusieurs types de virus, on prendra comme répondant à la maladie le virus dont le titre est le plus élevé (« critère du titre maximum »).

B. SECONDE ÉTAPE. — Dans la seconde étape, nous avons confronté les résultats obtenus chez un même malade par la séro-neutralisation et par l'isolement de la souche.

Cette deuxième étape a pu être parcourue avec la collaboration du Dr J. Maurin qui s'est chargé des isollements de virus dans les selles (technique décrite antérieurement), pendant que nous pratiquions dans un autre laboratoire les réactions de séro-neutralisation sur les prélèvements de sang.

Les deux séries de recherches ont été conduites *indépendamment l'une de l'autre* et les diagnostics portés individuellement dans chaque laboratoire sans aucune confrontation.

C'est seulement *ensuite* que nous avons procédé aux comparaisons.

Pour 86 cas diagnostiqués par les deux techniques, nous avons relevé immédiatement 13 discordances, le diagnostic d'un

type donné de virus poliomyélitique ayant été porté sérologiquement, alors que l'isolement de la souche avait conduit à l'obtention d'un autre type (voir tableau II).

TABLEAU II.

Prélèvements	I	II	III	Interprétation sérologique provisoire	Isolement	Interprétation sérologique "définitive"
n° 1	320	10 240	160	II	III	III
n° 2	320	10 240	1 280			
n° 1	640	160	2 560	III	I	I ou III
n° 2	640	160	2 560			
n° 1	2 560	2 560	160	I ou II	III	III
n° 2	5 120	5 120	640			
n° 1	640	10 240	640	II	III	I ou II ou III
n° 2	640	5 120	640			
n° 1	160	10 240	160	II	III	III
n° 2	320	10 240	640			
n° 1	640	0	160	I	III	I ou III
n° 2	640	0	320			
n° 1	1 280	320	2 560	III	I	I ou III
n° 2	640	160	5 120			
unique tardif	2 560	80	640	I	III	I ou III
unique tardif	5 120	640	640	I	III	I ou II ou III
unique tardif	1 280	10 240	640	II	III	I ou II ou III
unique tardif	640	640	5 120	III	I	I ou II ou III
n° 1	80	40	640	III	I	I
n° 2	320	20	640			
n° 1	1 280	20	160	III	I	III
n° 2	1 280	20	2 560			
n° 3	1 280	20	2 560			

Dans presque tous les cas, ces discordances nous ont paru relever de l'adoption du critère provisoire « du titre maximum » : dans 12 cas en effet sur 13, le titre le plus élevé des anticorps ne correspondait pas au virus isolé.

Nous avons donc supprimé ce critère provisoire reconnu sans valeur pour le remplacer par le suivant :

« Dans le cas où il existe des anticorps à titre élevé contre plusieurs types de virus et sans qu'il soit possible de constater d'un prélèvement à l'autre une variation dans le titre de ces anticorps, le virus en cause n'est pas obligatoirement celui contre lequel on observe le titre le plus élevé ».

Il est donc, dans ces conditions, sérologiquement impossible de conclure.

Forts de cette expérience nous avons repris les 13 cas du tableau II et nous avons procédé à nouveau à leur interprétation sérologique (colonne de droite du tableau).

On voit aussitôt disparaître dans 12 cas les discordances :

a) Dans 4 cas, nous avons pu ainsi porter avec certitude le diagnostic de type, confirmé par l'isolement de la souche.

b) Dans 8 cas, la sérologie est demeurée impuissante à elle seule à porter le diagnostic, le virus finalement isolé correspondant toujours cependant à un des anticorps de titre élevé.

Le 13^e cas est plus difficile mais s'interprète assez bien, compte tenu de l'histoire du malade et de la date des prélèvements : le prélèvement de selles a, en effet, été effectué avant le premier prélèvement sanguin ; il a permis l'isolement d'un virus de type I, contre lequel d'ailleurs il existe des anticorps dans les divers prélèvements de sérum au titre significatif de 1280.

Les prélèvements de sang effectués ensuite font saisir une ascension considérable des anticorps de type III : le virus de type III doit donc logiquement être considéré, nous semble-t-il, comme responsable d'une infection postérieure à la maladie de type I (probablement survenue pendant la période d'hospitalisation).

La modification des critères sérologiques ou leur confirmation par la comparaison avec la technique de l'isolement semble donc conduire à une situation tout à fait satisfaisante.

Si nous comparons en effet sur ces nouvelles bases les diagnostics sérologiques et les résultats de l'isolement pour les 86 cas simultanés dont nous disposons (tableau III), nous voyons que l'on peut grouper les résultats en 4 catégories.

TABLEAU III.

		Nombre des cas	% des résultats
1ère	Séroneutralisation +		
catégorie: Isolement	+	46	55 %
2ème	Séroneutralisation +		
catégorie: Isolement	0	20	23,5 %
3ème	Séroneutralisation ?		
catégorie: Isolement	+	18	21,5 %
4ème	Séroneutralisation 0		
catégorie: Isolement	+	0	0

Le premier groupe, avec coïncidence absolue des résultats garantit la *spécificité* de la séro-neutralisation.

Le dernier apporte la preuve de la *fidélité* des réactions de

séro-neutralisation (puisque'il n'y a pas d'élimination de virus sans sérologie positive contre le type en cause).

Le second s'explique par le caractère relativement tardif des prélèvements de selles faits à une période où l'élimination des virus est terminée mais où persistent, bien entendu, les anticorps.

Le troisième est celui des individus qui ont des titres élevés d'anticorps contre plusieurs types de virus et pour lesquels, par conséquent, il nous est impossible de conclure sérologiquement, le recours à l'isolement étant alors obligatoire.

Les critères d'identification sérologique que nous adopterons désormais (*critères définitifs*) seront donc finalement les 4 suivants, étant bien entendu qu'ils ne seront valables que chez un individu *non vacciné* contre la poliomyélite :

1° On peut exclure toute infection poliomyélitique récente si la séro-neutralisation est *négative* ou si le titre, *invariable* d'un prélèvement à l'autre, est *inférieur* ou égal à 160.

2° On peut conclure *formellement* en faveur d'un *type donné* de virus si l'on constate une *élévation de quatre fois* dans le titre des anticorps spécifiques de ce type (même si le titre terminal ne dépasse pas 160).

3° La poliomyélite d'un type donné est *hautement probable* si les titres, *invariables* et faibles par rapport à deux types de virus sont, au contraire, élevés à 640 ou plus contre le 3^e type (le pourcentage d'isollements positifs est, en effet impressionnant dans ce cas chez les malades).

4° La poliomyélite est simplement *possible* s'il existe des anticorps à un titre élevé (supérieur à 640) et *invariable* contre plusieurs types de virus.

Elle correspond alors *toujours* à l'un des virus contre lequel le titre est élevé, mais *pas obligatoirement* au titre le plus élevé.

Les résultats du tableau III permettent aussi de se rendre compte de la signification réciproque de la réaction de séro-neutralisation et de l'isolement pour le diagnostic étiologique de la maladie :

a) Dans 73,5 p. 100 des cas diagnostiqués, l'isolement, technique la plus longue et la plus difficile, est *inutile*, le diagnostic pouvant être porté par la seule réaction de séro-neutralisation.

b) L'isolement est également *inutile* dans les cas à sérologie constamment négative où l'isolement reste aussi régulièrement négatif.

c) L'isolement est, au contraire, *indispensable* pour la confirmation des cas sérologiquement « possibles », c'est-à-dire ceux

dans lesquels on constate un titre simultanément élevé contre plusieurs types de virus.

La position la plus logique pour le diagnostic de la maladie au laboratoire paraît donc être de demander toujours deux prélèvements successifs de sérum, correctement espacés dans le temps, et un prélèvement précoce de selles qui sera conservé à la glacière jusqu'au résultat des réactions de séro-neutralisation.

Si les résultats des SN sont *positifs* (poliomyélite certaine ou hautement probable), ou si la poliomyélite a pu être *exclue* sérologiquement, *l'examen des selles n'aura pas lieu*.

Si la poliomyélite apparaît sérologiquement possible, mais sans précision de type, *l'isolement devra alors être tenté*. S'il est positif, il apportera simultanément le diagnostic de certitude de la poliomyélite et la détermination du type responsable. S'il est négatif, la poliomyélite de type indéterminé reste possible.

C. TROISIÈME ÉTAPE. — Elle a consisté à passer au diagnostic sérologique de routine de la poliomyélite par l'utilisation systématique des réactions sur une grande échelle, seul procédé capable de préciser le rendement de la méthode et les perfectionnements ultérieurs susceptibles de lui être apportés.

TABLEAU IV.

	Prélèvements	Individus	Déchet "avant" le laboratoire	Diagnostics	Séro-N. sans conclusion
Nombre	960	670	240	295	135
			37 %	43 %	20 %
				10 %	33 %
				Exclusion: Diagnostic	
				de type	

Le laboratoire-pilote est passé à ce stade à partir du 1^{er} août 1959 et s'y est maintenu jusqu'à ce jour (les résultats rapportés ici auront simplement trait aux six premiers mois : c'est-à-dire jusqu'au 1^{er} février 1960).

Pendant cette période, 960 prélèvements correspondant à 670 individus ont été examinés avec les résultats exposés dans le tableau IV.

Le rendement global de la séro-neutralisation (exclusion et diagnostic de type) s'est donc élevé à 43 p. 100 environ, ce qui est déjà fort satisfaisant.

Ce rendement doit pourtant pouvoir être nettement accru par la réduction des marges déficitaires : celle des résultats déjà ininterprétables avant leur arrivée au laboratoire (marge des 37 p. 100), et celle des poliomyélites « possibles » (marge des 20 p. 100).

La première marge réductible (celle des 37 p. 100) devrait être de loin la plus facile : elle peut, en effet, être réduite à presque rien par un effort des cliniciens, car on y trouve des prélèvements mal faits, toxiques pour les cellules, contaminés ou hémolysés massivement et par suite totalement illisibles, voire des prélèvements perdus au cours du transport par suite d'une mauvaise obturation des flacons ou d'un scellage défectueux des ampoules, ou par suite de leur rupture consécutive à un défaut d'emballage.

On y trouve aussi des prélèvements dont les résultats ne peuvent être interprétés faute de renseignements sur le malade, les symptômes présentés, son âge (un titre à 160 contre un seul virus peut être pleinement significatif chez un nourrisson de 8 mois, mais sans intérêt chez un adulte), la notion d'une épidémie localisée (dans une même famille après une épidémie de poliomyélite-infection, le diagnostic sérologique de l'épidémie est, en effet, beaucoup plus facile à faire que le diagnostic sérologique individuel).

Ce chiffre de 37 p. 100 que nous donnons ici est d'ailleurs lui-même le premier exemple d'une réduction de la marge déficitaire : celle-ci s'élevait en effet à 55 p. 100 au début de nos essais (mois de mars, avril et mai) et a pu être réduite par la collaboration plus étroite et par la bonne volonté des cliniciens.

La deuxième marge réductible est celle des poliomyélites « possibles » (20 p. 100), où le diagnostic sérologique est hésitant.

Elle doit pouvoir être réduite aussi dans une proportion appréciable par l'envoi régulier de deux échantillons de sérum correctement échelonnés par rapport à la date de début de la maladie (le premier devant toujours être extrêmement précoce, c'est-à-dire fait dès la constatation des paralysies, le second devant obligatoirement avoir lieu quinze à vingt jours plus tard).

Cette règle des deux prélèvements est, en effet, susceptible d'augmenter beaucoup le nombre des variations sérologiques significatives [5] dans un groupe où malheureusement nous avons eu un pourcentage trop élevé de prélèvements uniques.

L'heureuse influence des doubles prélèvements peut d'ailleurs

être démontrée avec facilité par la comparaison entre la proportion des diagnostics obtenus sur prélèvement simple et la proportion des diagnostics effectués sur prélèvements doubles dans notre enquête (tableau V).

La réduction de la seconde marge par le double prélèvement

TABLEAU V.

	Nombre des individus examinés	Nombre des diagnostics	% de diagnostics	
Nombre d'individus à prélèvement unique	410	136	33 %	
Nombre d'individus à double prélèvement	260	159	63 %	
TOTAUX	670	295	44 %	Pourcentage moyen

ne saurait évidemment être complète par suite de la persistance de cas à anticorps multiples de titres élevés et sans variations significatives : c'est à ce résidu inévitable que devront précisément s'adresser, nous l'avons vu, les tentatives d'isolement.

RÉSUMÉ.

La « technique cinétique » de séro-neutralisation des virus poliomyélitiques est parfaitement applicable au diagnostic sérologique de la poliomyélite envisagé sur une large échelle : elle permet de réduire les isollements de souche à un minimum strictement indispensable et compatible avec le fonctionnement d'un laboratoire de diagnostic.

SUMMARY

PRACTICAL VALUE OF THE KINETIC SERONEUTRALIZATION TECHNIQUE.

The technique previously described by the authors is well adapted to the practice of serologic diagnosis of poliomyelitis on a large scale. It provides a reproducible and sensitive method of standardized seroneutralization for the evaluation of serum antibodies, thus allowing an important reduction in the number of virus isolations with the routine application of the method in a diagnosis laboratory.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRUMBACH (M^{lle}), ROGER (F.) et AYMARD (M^{lle}). *Semaine Hôp. (Ann. Pediatr.)*, 1960, **36**, 889/P. 157.
 - [2] LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (M^{me} A.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1959, **20**, 563-578.
 - [3] LÉPINE (P.), ROGER (F.), DAGUET (G.) et ROGER (M^{me} A.). *Semaine Hôp.*, 1960, **22**, 1406-1410.
 - [4] MARTIN (R.), ROGER (F.), DAMAS (J. P.) et ROGER (M^{me} A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 757-779.
 - [5] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 224-228.
-

L'ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM HUMAIN NORMAL

VI. — MOBILITÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES

par P. GRABAR, J. URIEL et J. COURCON (*).

(Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris)

La méthode d'analyse immuno-électrophorétique, développée en 1953 par l'un de nous avec C. A. Williams [3] a été depuis utilisée dans de nombreux travaux concernant l'étude de constituants protéiques d'origine et de nature diverses.

La dispersion électrophorétique dans un gel de gélose d'un mélange de protéines étant la première étape des deux que comporte la méthode (1), nous avons voulu vérifier la nature inerte du support de migration, c'est-à-dire l'absence, lors de l'électrophorèse, de facteurs d'interaction autres que ceux purement physiques entre le gel de gélose et les protéines. Il doit en résulter, pour la mobilité électrophorétique qui est, en immuno-électrophorèse, un des critères servant à l'identification des constituants, *une base d'utilisation plus rigoureuse*.

Nous ne faisons ici mention que de la dernière d'une série d'expériences similaires (et dont la première remonte déjà à plusieurs années), puisqu'elles ont toutes donné les mêmes résultats.

La deuxième partie de ce travail est un essai de caractérisation et de classification par leurs mobilités respectives des constituants protéiques du sérum décelés par l'analyse immuno-électrophorétique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Sérum humain normal (S. H. N.) : Un mélange de sérums humains normaux a été utilisé pour les expériences. Celles-ci ont été réalisées quelques jours seulement après prélèvement des sérums.

Immunsérum spécifique : L'immunsérum anti-sérum humain normal utilisé provenait d'un mulet (n° 282). Ce même immunsérum épuisé

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} mars 1960.

(1) L'autre étape étant la précipitation spécifique des antigènes dispersés par des anticorps homologues.

par différents constituants protéiques (sérumalbumine, γ -globulines, etc.) a servi pour les essais de caractérisation.

Lévane : Le contrôle du point de mobilité zéro a été fait avec un échantillon de lévane de poids moléculaire $\approx 150\,000$, aimablement mis à notre disposition par M. R. Dedonder.

ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE.

Le dispositif et la technique de Grabar et Williams [3] ont été employés. Les essais ont été menés dans un gel de gélose à 1 p. 100, imbibé de tampon véronal, véronal-sodique, de pH 8,2 et de force ionique 0,025. Un champ électrique de 5 volts/cm a été appliqué pendant quatre heures. Afin de permettre la séparation électrophorétique d'un plus grand volume de sérum, l'épaisseur des plaques de gélose dans l'électrophorèse préparative (voir ci-dessous) a été portée à 6 mm, au lieu de 3 à 4 mm dans la technique originale.

MARCHE DE L'EXPÉRIENCE.

1° ELECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE.

Une première plaque de gélose contenant un volume de 0,14 ml du mélange de SHN dans un réservoir de (20 $\times$ 5) mm² de surface, a été soumise à l'électrophorèse. Celle-ci terminée, la plaque a été découpée suivant deux lignes parallèles à l'axe de migration (fig. 1), de façon à diviser la plaque en trois zones : une zone centrale (ZC dans la fig. 1) de 14 mm de largeur qui traverse le réservoir de départ (R) et contenant par conséquent la presque totalité des constituants protéiques séparés lors de la migration électrophorétique ; et deux zones latérales (ZL, fig. 1). Ces deux zones ou bandes de gélose sont enlevées du support de verre, seule la zone centrale restant en place et servant à la suite de l'expérience.

2° CONTRÔLE DU POINT DE MOBILITÉ ZÉRO.

Simultanément et dans les mêmes conditions expérimentales, un échantillon de lévane placé dans une autre plaque de gélose a été soumis à l'électrophorèse. A la fin de celle-ci, la position de l'échantillon a été repérée par une technique décrite précédemment [6]. Le lévane étant électriquement inerte dans les conditions de l'expérience, sa position finale permet d'établir la ligne de mobilité zéro (axe AO dans la fig. 1) qui tient compte de l'effet electro-osmotique.

La ligne de mobilité zéro est reportée sur la plaque d'électrophorèse préparative. A partir de cette ligne et dans le sens anodique de la migration, la zone centrale de gélose (ZC) qui est restée sur la plaque de verre est découpée en 60 petites tranches de 2 mm de largeur.

3° ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE.

Chacune des petites tranches découpées a été déposée sur de nouvelles plaques de gélose, dans un réservoir de 15×3 mm, les interstices étant remplis avec de la gélose tamponnée fondue. Un sérum humain normal témoin a été placé dans un autre réservoir sur chaque plaque. Les plaques ont été soumises à l'analyse immuno-électrophorétique. Après développement des lignes de précipitation spécifique, les plaques ont été lavées et desséchées de la façon habituelle [4] et finalement soumises aux réactions

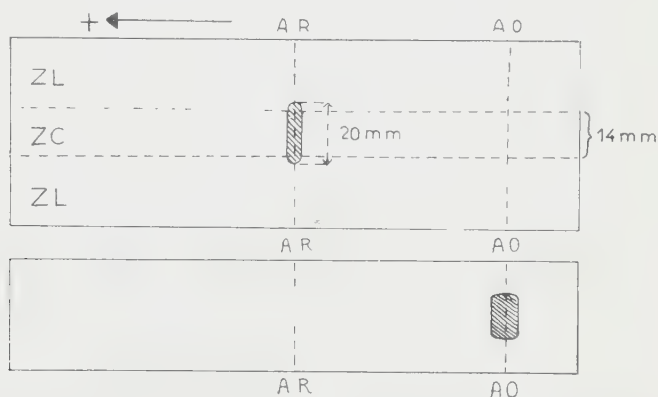


FIG. 1. — I. Electrophorèse préparative du sérum humain. AR-AR : axe qui traverse le réservoir de départ. — II. Electrophorèse d'une préparation de lévane servant à déterminer le point de mobilité zéro (axe AO-AO). LE (tache hachurée) : position de l'échantillon de lévane à la fin de l'électrophorèse (voir détails dans le texte).

colorées de caractérisation des protéines [4], des lipoprotéines [5] et de la céruloplasmine [7]. Les résultats ont été enregistrées par des photographies.

4° DÉTERMINATION DE LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES LIGNES DE PRÉCIPITATION.

Sur une ligne parallèle à l'axe de migration, on dresse une perpendiculaire passant par le sommet de l'arc de précipitation dont on veut déterminer la mobilité. La distance comprise entre cette perpendiculaire et le point de mobilité zéro sert pour le calcul de la mobilité électrophorétique du constituant protéique dont la diffusion a donné lieu à la ligne de précipitation en cause. On exprime la mobilité d'un constituant, x , soit en unités relatives ($UR = Ux/Ualb$), soit en unités absolues ($UA = Ux \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \cdot \text{sec.}^{-1}$).

Les mobilités relatives sont obtenues en prenant la mobilité en gélose de la sérumalbumine comme unité de référence [6].

Pour l'obtention des unités absolues, on se sert d'une échelle des mobilités UA [10] dont la valeur zéro coïncide avec le point de mobilité zéro et la valeur 6 avec la mobilité moyenne de la sérumalbumine après l'analyse immuno-électrophorétique (voir l'échelle UA dans la fig. 4). Cette valeur $U_{alb.} = 6$ représente la mobilité de la sérumalbumine dans l'appareil de Tiselius, dans des conditions expérimentales semblables à celles de l'essai électrophorétique en gélose [10].

RÉSULTATS.

A. VÉRIFICATION DE LA NATURE INERTE DU SUPPORT DE MIGRATION.

L'analyse immuno-électrophorétique (A. I. E.) de chacune des petites tranches de gélose, provenant d'une première électrophorèse préparative du sérum, permet de déterminer : a) le nombre des constituants protéiques contenus dans la tranche respective ; b) la mobilité électrophorétique de chacun de ces constituants.

Dans les figures 2 et 3 sont groupés les résultats de l'A. I. E. d'environ la moitié des tranches découpées dans la première bande de migration (ZC, fig. 1). On constate, en général, l'excellent accord entre la position d'une tranche dans la bande d'électrophorèse préparative et la mobilité des constituants protéiques que la tranche renferme, lorsque celle-ci a été soumise à l'A. I. E., voire à une nouvelle séparation électrophorétique. Le cas des γ -globulines sériques est particulièrement démonstratif. Ces globulines donnent généralement, en immuno-électrophorèse, une seule ligne de précipitation dont la mobilité s'étale sur toutes les zones de mobilité γ_1 , β_2 et une partie de la zone β_1 . Une telle disposition n'est pas due à des phénomènes d'absorption ou de ralentissement par le gel, mais à l'existence d'une véritable famille de molécules protéiques ayant des mobilités électrophorétiques différentes et bien définies, mais une même spécificité immunochimique [2, 3]. On peut, par exemple, remarquer (fig. 2) le gradient des mobilités des γ -globulines appartenant aux tranches n^{os} 1, 3, 5, etc.

Dans la figure 4 sont groupés schématiquement les résultats de l'ensemble de l'expérience. En haut de la figure a été représentée la bande d'électrophorèse préparative (zone centrale ZC)

FIG. 2. — Analyse immuno-électrophorétique des tranches découpées de la plaque d'électrophorèse préparative. Z = zones de migration électrophorétique. SHN = A. I. E. du sérum humain normal servant de témoin. T = numéro d'ordre des tranches à partir du point de mobilité zéro (0).

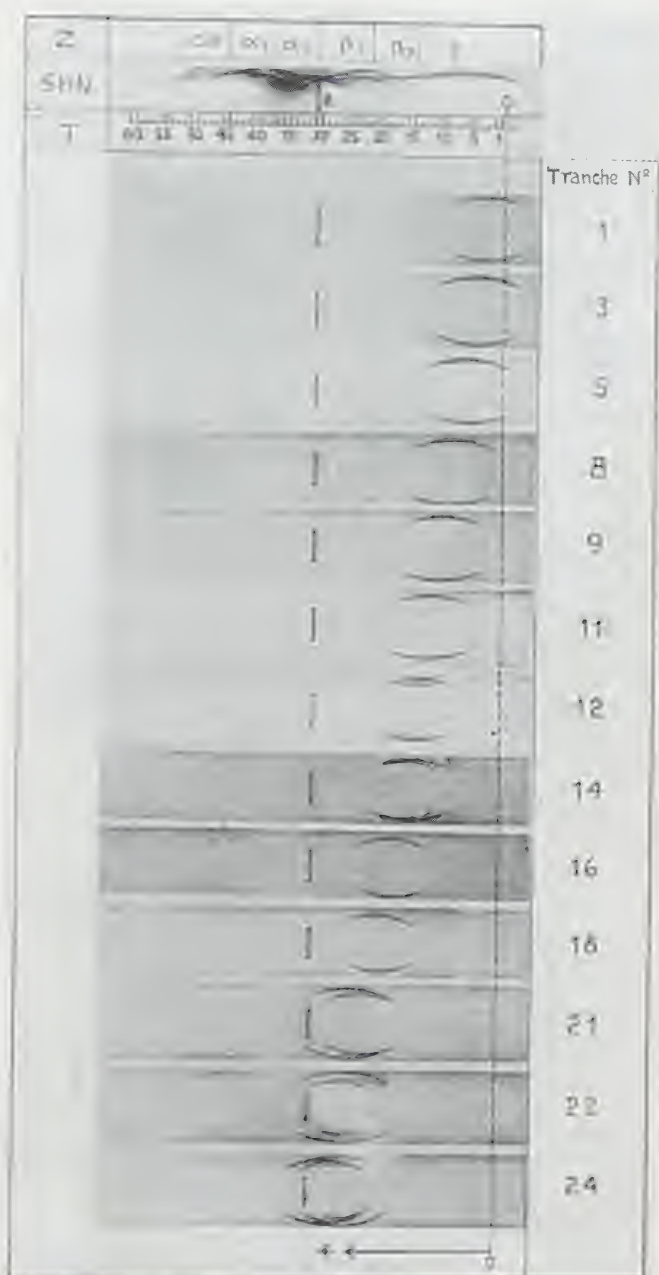


Fig. 2.

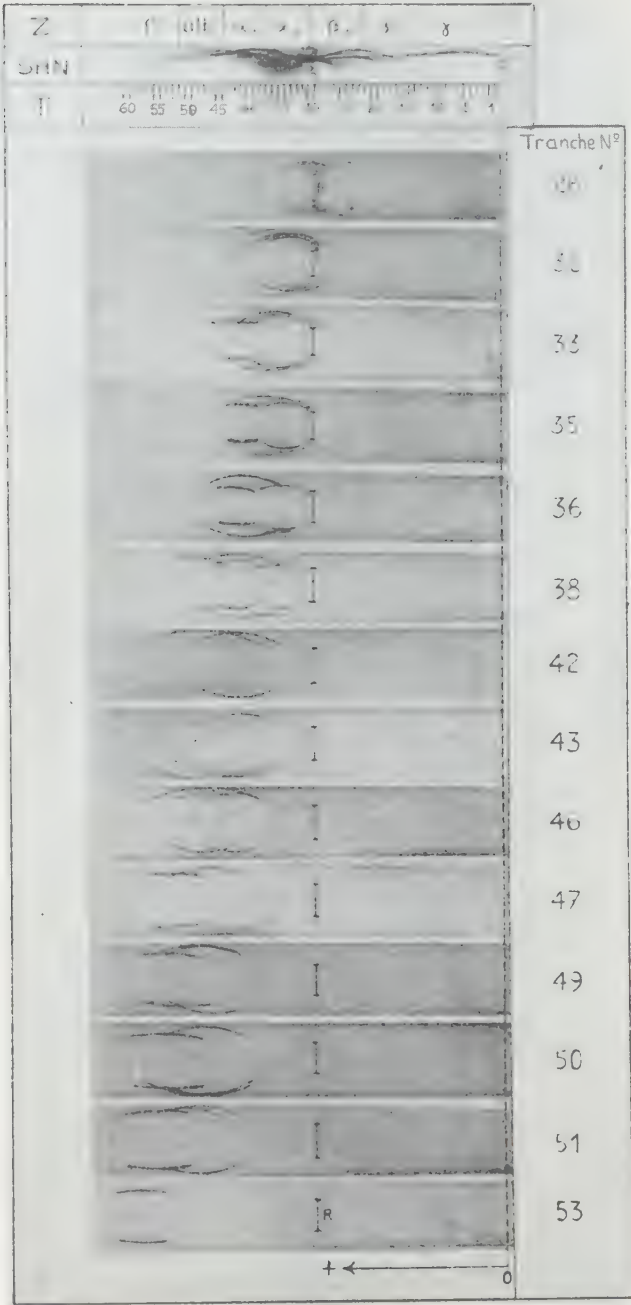


FIG. 3. — Même légende que figure 2.

et sur elle, numérotées de 1 à 60, les tranches découpées et soumises ensuite à l'A. I.-E. Des deux côtés de la bande, les résultats de cette analyse montrent les constituants protéiques caractérisés dans chaque tranche. On peut remarquer que les protéines du sérum s'étalent sans solution de continuité d'une extrémité à l'autre de la bande de migration. Il y a, cependant, accumulation de constituants à certains endroits, ce qui justifie la classification de Tiselius en globulines α , β , γ , etc.

Cette même classification a été suivie, pour grouper les lignes de précipitation décelées, par l'A. I.-E. du sérum humain. Quant à la délimitation des zones de migration α , alb. α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et γ , elle a été faite d'une façon conventionnelle, mais après étude d'un grand nombre de sérums tant par l'électrophorèse simple en

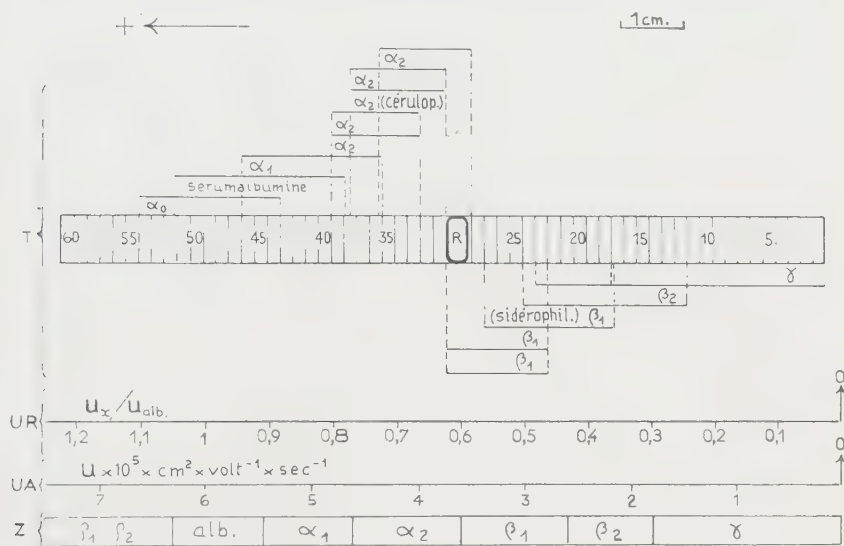


FIG. 4. — T = numéro d'ordre des tranches. UR = mobilités relatives. UA = mobilités absolues. Z = zones de migration électrophorétique.

gélose que par l'A. I.-E. Les limites de nos différentes zones de migration correspondent assez bien à celles classiquement établies en électrophorèse libre [4].

B. MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES SÉRIQUES DÉNOMBRÉES PAR L'ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE.

Suivant le procédé décrit plus haut, nous avons déterminé la mobilité électrophorétique des protéines contenues dans chacune des 60 petites tranches soumises à l'A. I.-E.

TABLEAU I.

Constituants protéiques du	Mobilités moyennes		Valeurs extrêmes	
	$u \times 10^5 \text{ cm}^2$ volt.-l. .sec.-l	$\frac{u}{u_{alb.}}$	$u \times 10^5 \text{ cm}^2$ volt.-l. .sec.-l	$\frac{u}{u_{alb.}}$
sérum humain normal	A. I. E.	A. I. E.	A. I. E.	A. I. E.
Globulines γ			0 - 2,94	0 - 0,48
(macroglobuline) β_2M	2,40	0,41		
β_2C	2,00	0,34		
β_2A			1,66 - 2,74	0,28 - 0,46
(sidérophiline) β_1	2,83	0,48	2,70 - 2,95	0,45 - 0,49
β_1B	3,03	0,51	3,00 - 3,10	0,50 - 0,52
β_1A	3,23	0,54	3,18 - 3,30	0,53 - 0,55
(haptoglobine) α_2	3,95	0,66	3,92 - 4,16	0,66 - 0,70
α_2	4,05	0,68	4,00 - 4,16	0,67 - 0,70
(céruloplasmine) α_2	4,16	0,70	4,05 - 4,28	0,68 - 0,72
α_2	4,43	0,74	4,40 - 4,52	0,74 - 0,76
α_2	4,52	0,76	4,44 - 4,65	0,75 - 0,78
(glycoprotéine) α_1A (S = 3,5)	5,18	0,87	5,08 - 5,36	0,85 - 0,90
(Sérumalbumine)	5,94	1	5,36 - 6,12	0,90 - 1,15
(Séromucoïde) α_0	6,0	1,05	5,66 - 6,12	0,95 - 1,15

* Valeurs de mobilité tirées du travail de H. E. Schultze et ses collaborateurs. Z. Naturforsch. 1953, 10 b, 463.

L'identification des lignes de précipitation a été faite à l'aide des réactions colorées de caractérisation et par l'emploi d'immunsérums convenablement épuisés.

En raison de la dilution des protéines à la fin du double essai de séparation électrophorétique (l'électrophorèse préparative et l'A. I.-E.), une partie des constituants sériques habituellement décelables en immuno-électrophorèse a échappé aux limites de sensibilité de cette méthode.

Le tableau I groupe uniquement les mobilités électrophorétiques des constituants détectés et identifiés lors de l'expérience que nous venons de rapporter. Dans la première colonne de ce tableau, les constituants sont classés selon la zone de mobilité électrophoré-

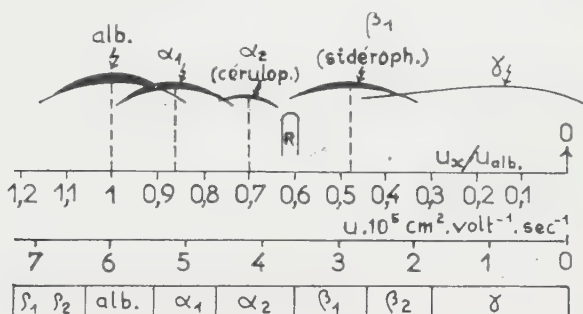


FIG. 5. — R = réservoir de départ. O = point de mobilité zéro (voir détails dans le texte).

tique (γ , β , α ...) à laquelle ils appartiennent. La deuxième colonne montre la mobilité moyenne en unités absolues, U_x , et relatives, $U_x/U_{alb.}$. La troisième colonne enfin donne les mobilités extrêmes exprimées dans les mêmes unités. Ces valeurs extrêmes sont la seule référence possible pour les constituants dont la mobilité électrophorétique et par conséquent la ligne de précipitation que chacun d'entre eux forme s'étale sur une ou plusieurs zones de migration. C'est, par exemple, le cas des γ -globulines, de la β_2 -macroglobuline, etc.

Sous la désignation de globulines α_0 sont inclus les constituants ayant une mobilité électrophorétique voisine de celle de l'albumine et supérieure au groupe des globulines α_1 .

Parmi tous les constituants sériques dénombrés par l'A. I.-E., quatre ont été choisis comme repère de tous les autres. Il s'agit de la sérumalbumine, l' α_1 -globuline principale, la céruloplasmine (une α_2 -globuline) et la sidérophiline (une β_1 -globuline). La figure 5 montre la position de leurs lignes de précipitation spécifique sur le champ de migration électrophorétique. Le choix de ces consti-

tuants a été motivé par les faits suivants : a) il s'agit de protéines fortement antigéniques, presque tous les immunosérums anti-sérum humain total examinés jusqu'à présent dans ce laboratoire possédaient les anticorps homologues ; b) les écarts de mobilité de ces constituants sont relativement faibles ; c) leurs rapports de mobilité

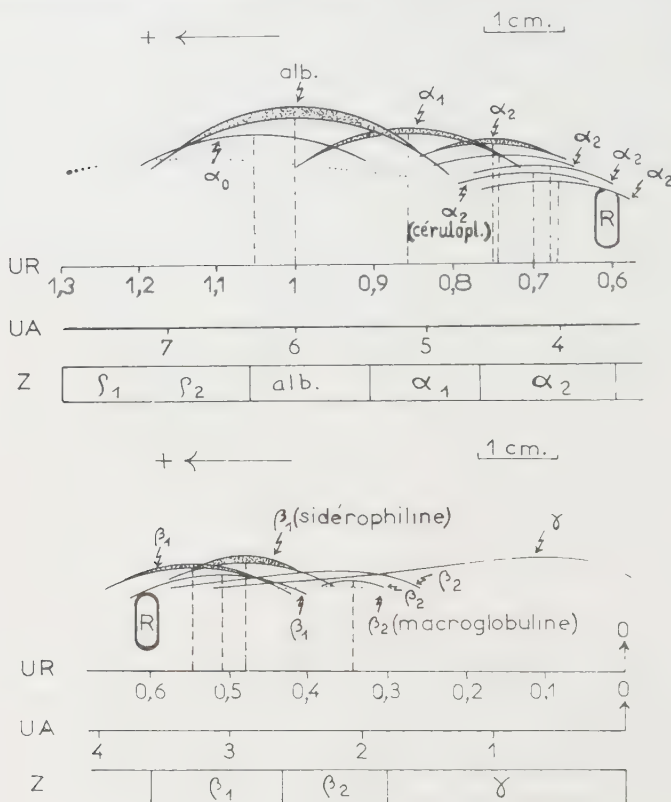


FIG. 6. — UR = mobilités relatives. UA = mobilités absolues ($\times 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$). En pointillé (en haut), ligne de précipitation des lipoprotéines rapides.

sont sensiblement constants d'un essai à l'autre, quelles que soient les conditions expérimentales ; d) à l'exception de la céruloplasmine qui, par ailleurs, peut être reconnue par une réaction caractéristique, les trois autres constituants choisis donnent des lignes de précipitation facilement reconnaissables, même en l'absence de toute réaction colorée de caractérisation.

La figure 6 est une reconstitution du diagramme immuno-électro-

phorétique du sérum humain normal d'après les données tirées de l'expérience que nous venons de rapporter. Toutes les lignes de précipitation dénombrées sont représentées à leur place sur le diagramme immuno-électrophorétique, de même que leurs mobilités moyennes respectives. Le diagramme a été représenté en deux parties : une comprenant les constituants appartenant aux zones de migration ϱ , albumine, α_1 et α_2 (en haut de la figure), et une deuxième partie (en bas de la figure) où sont représentés les constituants des zones de migration β_1 , β_2 et γ . Certains constituants mineurs pouvant être décelés dans le sérum humain ne sont pas figurés sur ce diagramme.

C. MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES LIPOPROTÉINES SÉRIQUES.

L'application des techniques de détection de lipides à l'électrophorèse en gélose [5] a permis de caractériser, dans le sérum humain normal, plusieurs lipoprotéines appelées, en se rapportant à leur mobilité électrophorétique : α_2 -lipoprotéine, α_1 -lipoprotéine, lipoalbumine et ϱ_2 -lipoprotéine. Étudiées par l'analyse immuno-électrophorétique, ces lipoprotéines donnent trois lignes de précipitation : une pour la lipoalbumine, laquelle s'identifie avec la ligne de précipitation de la sérumalbumine (2) ; une pour le constituant lipidique de mobilité α_2 ; et une troisième commune aux fractions ϱ_2 et α_1 , ce qui prouve l'identité immunochimique de ces deux lipoprotéines et semble indiquer qu'il s'agit d'une même « famille » de molécules protéiques ayant des mobilités différentes (voir figure 7).

Cependant : a) l' α_2 -lipoprotéine et, à un moindre degré, l'ensemble ϱ_2 + α_1 -lipoprotéines présentent un phénomène de ralentissement [5] dans leur migration électrophorétique, en fonction de la concentration soit de la lipoprotéine elle-même, soit d'autres fractions protéiques du sérum ; b) les proportions relatives des lipoprotéines ϱ_2 et α_1 varient en fonction du temps écoulé entre le moment du prélèvement du sang et celui de l'essai électrophorétique : au fur et à mesure que l'intervalle de temps grandit, la fraction ϱ_2 augmente, tandis que l' α_1 diminue, bien que la concentration totale α_1 + ϱ_2 reste apparemment inchangée [6].

En raison de ces faits, il devient impossible, sauf pour la lipoalbumine, de fixer avec précision la mobilité électrophorétique en gélose des lipoprotéines sériques. Il serait donc plus rationnel d'appeler simplement lipoprotéines « rapides » celles du groupe ϱ_2 + α_1 et lipoprotéines « lentes » celles de la fraction α_2 . Cette

(2) La lipoalbumine n'est pas strictement une lipoprotéine. On a désigné [5] sous ce terme une fraction de la sérumalbumine liée à des substances lipidiques.

dernière a été identifiée [5] aux lipoprotéines de faible densité (définies par l'ultracentrifugation), tandis que l'ensemble α_2 et α_1 l'a été avec celle de haute densité [6].

Les dénominateurs lipoprotéines « lentes » et « rapides », en ne précisant rien sur la mobilité électrophorétique, éviteraient les confusions avec d'autres classifications des lipoprotéines, basées

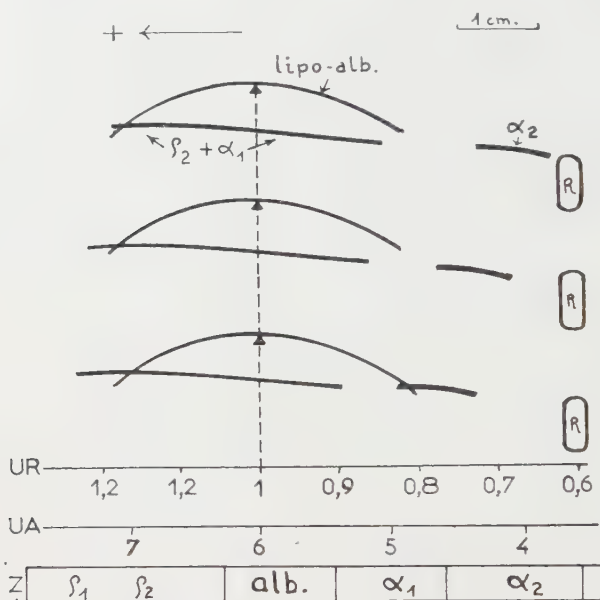


FIG. 7. — Effet sur la mobilité électrophorétique des lipoprotéines sériques de la diminution progressive (de haut en bas) du volume de la prise d'essai.

sur des critères de mobilité établis à partir d'autres méthodes d'électrophorèse de zone (papier, amidon, etc.).

Nos résultats concernant la migration électrophorétique des lipoprotéines lentes sont en contradiction avec les conclusions de Wieme [9], selon lesquelles il y aurait interaction précipitante entre ces lipoprotéines et la gélose. Après l'électrophorèse préparative, les lipoprotéines lentes se situent dans la zone des α_2 -globulines (fig. 7); reprises dans cette zone et soumises ensuite à l'A. I.-E., elles se déplacent à nouveau dans la zone α_2 et même plus en avant. En cas d'un effet précipitant de la gélose comme le suppose Wieme, ces lipoprotéines devraient rester dans le réservoir de départ ou tout au moins être ralenties dans leur migration.

DISCUSSION.

D'une façon générale, les résultats donnés ci-dessus semblent prouver la nature inerte du gel de gélose comme support de migration électrophorétique des protéines du sérum. D'autre part, les valeurs de mobilité obtenues par électrophorèse libre et celles que nous avons calculées en utilisant une échelle des mobilités arbitraire (voir plus haut) montrent un accord raisonnable (tableau I). Tout ceci explique la bonne reproductibilité de la méthode d'analyse immuno-électrophorétique et justifie l'emploi de la mobilité électrophorétique comme critère d'identification des protéines. Toutefois, quelques considérations pouvant être tirées de ces résultats méritent d'être discutées plus en détail.

Il s'agit d'abord de l'existence de mobilités différentes (tableau I) pour un même constituant, ces mobilités ayant été déterminées après le deuxième essai électrophorétique (après l'A. I.-E.). L'exemple de la sérumalbumine est, à ce sujet, assez démonstratif. Après l'électrophorèse préparative du sérum total on retrouve des molécules de sérumalbumine dans une zone de migration qui s'étale de la tranche n° 38 jusqu'à la tranche n° 52 (fig. 4). L'A. I.-E. du sérum humain total donne pour la sérumalbumine une mobilité d'environ $6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{volt.}^{-1}.\text{sec.}^{-1}$, tandis que l'A. I.-E. de chacune des quinze tranches comprises entre les numéros 38 et 52 montre un gradient de mobilité allant de 5,36 à 6,10 ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{volt.}^{-1}.\text{sec.}^{-1}$). On remarque, en plus, que l'augmentation progressive des mobilités coïncide avec l'accroissement des numéros d'ordre de tranches de gélose. Autrement dit, une molécule de sérumalbumine provenant, par exemple, de la tranche n° 40 a une mobilité plus lente qu'une molécule provenant de la tranche n° 50. Ce fait semble prouver que la dispersion électrophorétique de la sérumalbumine est due non seulement à la diffusion libre de la protéine pendant l'électrophorèse, mais aussi à l'existence d'un certain degré de microhétérogénéité parmi les molécules de cette fraction. Bien qu'il ne soit pas possible d'affirmer à quoi cela est dû, il est cependant permis de penser que la haute capacité d'interaction entre la sérumalbumine et des substances diverses (métaux, lipides, phosphatides, hormones, etc.), en facilitant la formation de complexes, peut expliquer une telle hétérogénéité des mobilités.

Le cas de la sérumalbumine n'est pas le seul qui ait pu être soulevé parmi les protéines du sérum, mais la faible concentration de la plupart des autres constituants en cause n'a pas permis de se prononcer à leur sujet d'une façon catégorique. Naturellement, le problème que nous discutons ne se pose que pour certains

constituants sériques considérés classiquement comme électrophorétiquement homogènes.

L'utilisation de la mobilité électrophorétique comme critère d'identification dans l'analyse immuno-électrophorétique des protéines sériques n'est pas sans limitations. En effet, la migration en gélose est influencée par de nombreux facteurs ; ainsi :

a) *La nature de la gélose.* Celle-ci étant un produit naturel, non « standardisé », sa composition varie selon les provenances et même selon les lots d'une même origine.

b) *La préparation des gels.* Lavages, traitements physiques et chimiques de la gélose, etc., peuvent modifier de manière variable les propriétés du produit initial.

c) *La teneur en eau du gel.* Elle peut changer lors de l'électrophorèse en fonction surtout de deux facteurs : le courant d'électro-osmose et l'évaporation. Ces changements agissent sur la migration électrophorétique d'une façon difficilement contrôlable.

d) *La durée de l'essai.* La vitesse de migration avec la technique habituelle n'est constante que pendant les cinq premières heures.

e) *La concentration en protéines du mélange soumis à l'A. I.-E.* En dehors de certaines limites, variables selon les constituants et les conditions expérimentales, elle peut avoir un effet sur la vitesse de migration et altérer les rapports de mobilité (mobilités relatives) entre les constituants du mélange.

f) *Le vieillissement des échantillons sériques analysés.* La mobilité de certaines protéines (lipoprotéines, complément) du sérum est très influencée par le temps écoulé entre le moment de la prise de sang et de son analyse électrophorétique.

g) *La présence de certaines protéines de constitution particulière* [lipoprotéines, macroglobulines (3)] qui, en gélose, peuvent montrer des phénomènes de ralentissement [5, 8].

Il est évident qu'une partie des facteurs énumérés peut être contrôlée en utilisant des conditions expérimentales rigoureusement identiques d'un essai à l'autre, ou en se servant, comme étalon pour l'identification, des unités relatives de mobilité, plutôt que des valeurs absolues. Mais l'influence d'autres facteurs est imprévisible ou leur contrôle exigerait des dispositifs techniques compliqués ou onéreux au détriment de la simplicité de la méthode.

Si à tout ceci on ajoute que de nombreux constituants protéiques du sérum ont des valeurs de mobilité très voisines (tableau I), on comprend bien que la mobilité électrophorétique constitue dans l'A. I.-E. un critère d'identification insuffisant et

(3) Le ralentissement des macroglobulines en gélose a été observé par Wieme, surtout lorsqu'il utilisait des conditions expérimentales particulières (voltage très élevé). Dans nos conditions habituelles, nous n'avons pas remarqué ce phénomène.

qu'il doit être complété par des critères immunochimiques (utilisation d'immunsérums spécifiques convenablement épuisés) et chimiques (emploi des réactions spécifiques de caractérisation).

RÉSUMÉ.

Une expérience de double dispersion électrophorétique en gélose d'un échantillon de sérum humain a permis de montrer l'absence des facteurs d'interaction autres que ceux purement physiques entre le gel de gélose et les protéines.

Les mobilités électrophorétiques des constituants sériques décelés par l'analyse immuno-électrophorétique ont été déterminées en vue de les utiliser comme critère de classification et de caractérisation en immuno-électrophorèse. Les modalités d'application de ce critère et ses limitations sont discutées.

Plusieurs constituants sériques considérés classiquement comme homogènes (sérumalbumine par exemple) se révèlent posséder un certain degré de microhétérogénéité électrophorétique.

SUMMARY

IMMUNO-ELECTROPHORESIS OF NORMAL HUMAN SERUM.

VI. — ELECTROPHORETIC MOBILITIES.

Electrophoretic double dispersion in agar gel showed the absence in a human serum sample of any interaction factor other than physical between the agar and the proteins.

The electrophoretic mobilities of the serum constituents have been determined with a view to utilize them as classification and characterization criteria. The practical applications of these criteria and their limitations are discussed.

Several serum constituents conventionally considered as homogeneous (serumalbumin, for example) proved to possess a certain degree of electrophoretic micro-heterogeneity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DOLE (V.). *J. clin. Invest.*, 1944, **23**, 708.
- [2] GRABAR (P.). *III^e Congr. Intern. Biochem. Bruxelles*, 1956, **37**.
- [3] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193 ; 1955, **17**, 67.
- [4] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
- [5] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, **38**, 1253.
- [6] URIEL (J.). *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 204 et 384.
- [7] URIEL (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, suppl. n° 1, 105.
- [8] WIEME (R. J.). *Rev. Belge Path. Med. exp.*, 1957, **25**, 62.
- [9] WIEME (R. J.). In *Studies on agar electrophoresis*, Arscia Uitgaven N. V./Bruxelles, 1959.
- [10] WILLIAMS (C. A. Jr) et GRABAR (P.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 158.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPLEXE ANTIGÉNIQUE « O » DES VIBRIONS

RELATIONS IMMUNOLOGIQUES ENTRE *V. CHOLERA*
ET VIBRIONS DITS INAGGLUTINABLES (NAG)

par J. GALLUT (*)

(avec la collaboration technique de J. QUINIOU)

(Institut Pasteur)

Dans le chapitre consacré à l'Immunologie de la Monographie *Le Choléra* publiée par l'O. M. S. [1], l'auteur R. Pollitzer et son collaborateur W. Burrows ont écrit fort justement, au sujet des antigènes cholériques O et H :

« La publication de Gardner et Venkatraman [2] peut être considérée comme la charte de nos connaissances actuelles sur la structure antigénique des vibrions cholériques et pseudo-cholériques. »

Ils ajoutent toutefois, un peu plus loin, ce correctif :

« Le problème des antigènes somatiques de *V. cholerae* est loin d'être pleinement résolu. Il n'est donc pas étonnant de voir que, sur ce point, une certaine circonspection a souvent succédé à l'optimisme adopté dans les années qui ont immédiatement suivi la publication des observations fondamentales de Gardner et Venkatraman (1). Aussi, de nombreux chercheurs ayant l'expérience du choléra dans l'Inde sont, pour une raison ou une autre, enclins à penser que des vibrions autres que *V. cholerae* peuvent de temps en temps contribuer au choléra. »

Pollitzer et Burrows précisent cependant que, selon l'opinion des Experts du Choléra de l'O. M. S. (1952), « les lacunes persistantes de nos connaissances à cet égard ne diminuent en rien la

(*) Manuscrit reçu le 5 février 1960.

(1) Gardner et Venkatraman ont soumis 101 souches de vibrions, cholériques et pseudo-cholériques, aux épreuves d'agglutinations croisées de leurs suspensions microbiennes vivantes par les sérums O préparés avec les vibrions chauffés deux heures à 100°.

Cette méthode a permis de classer les 101 souches en plusieurs sous-groupes O, parmi lesquels un seul (sous-groupe I) renfermait toutes les souches authentiques de *V. cholerae* exclusivement.

valeur pratique des tests adoptés pour le diagnostic biologique du choléra ».

On sait que, du point de vue sérologique, ce diagnostic est basé réglementairement [3] sur l'agglutination au taux minimum de 1/100 (sur lame) du vibrion suspect par un sérum choléra O non différentiel, qui peut être soit un sérum de lapin immunisé avec une préparation internationale de référence [4] de l'antigène cholérique O (Inaba ou Ogawa), soit, à défaut, un sérum de lapin immunisé avec une souche de *V. cholerae* authentique chauffée à 100°. Le diagnostic du type de *V. cholerae* est fait secondairement par agglutination au moyen des sérums O non différentiels saturés par les types hétérologues ou des préparations internationales de référence des sérums anti-cholériques monospécifiques Inaba et Ogawa [4].

Les vibrions qui ne satisfont pas à l'épreuve d'agglutination par le sérum anti-cholérique O sont dits *inagglutinables* (vibrions NAG). Nous emploierons dans ce travail cette appellation, classique bien qu'abusive, en précisant qu'elle ne fait pas préjuger de l'agglutination de ses vibrions par leur sérum homologue ou par tout autre sérum O non cholérique.

Le diagnostic sérologique de *V. cholerae* repose donc entièrement sur la spécificité de l'antigène cholérique thermostable O, celle-ci étant considérée comme démontrée par les travaux de Gardner et Venkatraman. Cependant, plusieurs chercheurs ont mis en évidence ultérieurement l'existence de coagglutinines cholériques O dues soit à des bactéries d'espèces différentes (*Brucella* [5], *Salmonella* [6], *Entérobactériacées* [7]), soit même à des vibrions banaux [8, 9, 10] chez lesquels ont été trouvés des facteurs antigéniques cholériques O mineurs non spécifiques. On doit toutefois indiquer que, sur ce dernier point, la question a été fortement contestée [11, 12], bien qu'il semble *a priori* difficile d'admettre que le privilège de posséder des facteurs antigéniques O communs à *V. cholerae* soit accordé à certaines bactéries d'espèces différentes et refusé à des vibrions qui, par beaucoup de leurs caractères (morphologiques, culturels et biochimiques notamment) se rapprochent davantage du vibrion cholérique.

Ces faits justifient donc entièrement, à notre avis, qu'en conclusion du paragraphe précité [1], Pollitzer et Burrows aient écrit : « La nécessité de nouvelles recherches sur les antigènes de *V. cholerae* doit être tenue pour vitale... Ces recherches devront comporter une nouvelle enquête sur le complexe antigénique O, notamment en ce qui concerne les antigènes inapparents ou bloqués. »

Le sérum cholérique spécifique, utilisé pour le diagnostic du choléra, qu'il soit une préparation internationale de référence ou un sérum préparé directement par son utilisateur, est un sérum

de lapin immunisé par l'antigène cholérique O *total*. Celui-ci, nous l'avons dit, consiste dans des *V. cholerae* (Inaba ou Ogawa, récoltés après dix-huit heures de culture à 37°) dont on a éliminé les antigènes thermolabiles H non spécifiques par un chauffage à 100° pendant un temps suffisant, soit, suivant les auteurs, de deux à trois heures. Les *V. cholerae* qui constituent les préparations internationales de référence d'antigène cholérique O de l'O. M. S. ont subi, en outre, une précipitation et un lavage préalables à l'éthanol avant d'être chauffés deux heures et demie à 100°, puis desséchés dans le vide après congélation [13].

On voit donc que l'antigène cholérique O est, en principe, constitué par la totalité des corps microbiens modifiés par chauffage. On pouvait se demander si le fractionnement des corps microbiens de vibrions d'origines diverses, pratiqué avant ou après ce chauffage, ne conduirait pas à l'obtention d'antigènes thermostables différents de l'antigène O total et, dans l'affirmative, ne permettrait pas de déceler dans des vibrions NAG des antigènes communs à *V. cholerae*. C'est dans ce sens que nous avons entrepris le présent travail dans lequel nous avons soumis à des méthodes immunochimiques un certain nombre de vibrions « agglutinables » (*V. cholerae* et *V. El Tor*) et de vibrions NAG [vibrions isolés des eaux et vibrions d'animaux à sang froid, de préférence aquatiques (2)]. Les antigènes ainsi obtenus ont été soumis à des épreuves sérologiques vis-à-vis de leurs antisérums et des sérums préparés avec les antigènes cholériques O de référence internationale.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — SOUCHES MICROBIENNES.

Nous avons utilisé au total 29 souches de vibrions, toutes exclusivement de forme S, comprenant 14 vibrions agglutinables par les sérums choléra O non-différentiels Inaba et Ogawa et 15 vibrions NAG.

A. *Vibrions* « agglutinables ».

a) *V. cholerae* :

Type Inaba : n° 569 B (Haffkine Institute, Bombay, 1953) ; 99 (Dr Ahuja, Kasauli, 1954) ; El Kourein (Egypte, 1947).

Type Ogawa : 41 (National Institute of Health, 1948) ; 23 (Dr Burrows, Calcutta, 1953) ; 112 (Dr Burrows, Calcutta, 1953).

Type Hikojima : 1046 (Saïgon, 1931) ; Shanghai 3 (Chine, 1932).

Toutes ces souches possèdent les caractères biochimiques classiques (3) (CR +, H gr. I, h —, VP —).

(2) L'importance des animaux aquatiques comme hôtes éventuels de *V. cholerae* a été soulignée par Pollitzer [14].

(3) CR = choléra-roth, H = groupe fermentatif de Heiberg, h = hémolyse (mouton), VP = réaction de Voges-Proskauer.

b) *V. El Tor*, tous du type Hikojima :

- El Tor n° 4 (Gotschlich, Hedjaz, souche très ancienne) ;
 El Tor n° 14 (Gotschlich, Hedjaz, souche très ancienne) ;
 El Tor n° 47 (Gotschlich, Hedjaz, souche très ancienne) ;
 Makassar n° 676 (De Moor, Célèbes, 1937-1938) ;
 Makassar n° 757 (De Moor, Célèbes, 1937-1938) ;
 Makassar n° 770 (De Moor, Célèbes, 1937-1938).

Toutes ces souches possèdent les caractères biochimiques classiques (CR +, H gr. I, h +, VP +).

B. *Vibrions NAG*, d'origines diverses et de caractères biochimiques variables.

a) Souches isolées de l'eau en Egypte, au cours de l'épidémie de choléra de 1947 :

- Ea2ci [eau douce] (CR —, H gr. III, h —, VP +) ;
 Eu5 [eau de mer] (CR +, H gr. I, h +, VP +) ;
 Ez5cp [eau de mer] (CR +, H gr. I, h +, VP —).

b) Souches isolées d'animaux, provenant toutes de l'Institut Pasteur de Saïgon, Vietnam (Dr Chambon) :

- 1 [serpent d'eau] (CR —, H = 0, h +, VP +) ;
 46 [tortue d'eau] (CR —, H gr. I, h +, VP —) ;
 391 [crapaud] (CR —, H gr. I, h +, VP +) ;
 418 [crapaud] (CR —, H gr. I, h +, VP +) ;
 419 [crapaud] (CR —, H gr. V, h —, VP —) ;
 517 [huître d'eau douce] (CR —, H gr. V, h —, VP —) ;
 526 [huître d'eau douce] (CR —, H gr. I, h —, VP —) ;
 527 [huître d'eau douce] (CR —, H gr. I, h —, VP —) ;
 532 [huître d'eau douce] (CR —, H gr. V, h —, VP —) ;
 535 [huître d'eau douce] (CR —, H gr. V, h —, VP —) ;
 548 [crabe d'eau douce] (CR —, H gr. V, h —, VP —) ;
 582 [crabe d'eau douce] (CR —, H gr. V, h —, VP —).

II. — PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

Pour le *fractionnement des corps microbiens*, nous avons choisi la méthode au phénol (Palmer et Gerlough, 1940), que nous avons utilisée antérieurement avec succès pour l'étude immuno-chimique de *V. fetus* et de vibrions d'origine bovine apparentés à cette espèce [15, 16]. Cette méthode a déjà été appliquée partiellement à *V. cholerae* par Shrivastava, Singh et Ahuja [17] pour la préparation du polyside cholérique.

Chaque souche a été cultivée sur 30 boîtes de Roux de gélose peptonée, pH 8,0, pendant dix-huit heures à 37°. La récolte, lavée en eau physiologique (NaCl, 8,5 g p. 1 000) puis à l'acétone, est desséchée sous vide à la température du laboratoire. Les quantités de vibrions secs obtenus étaient comprises entre 1,6 et 9,4 g par souche. Les vibrions secs broyés au mortier ont été mis en suspension dans du phénol à 95 p. 100, à raison de 1 g/100 ml, pendant vingt-quatre heures à 41° avec agitation répétée à plusieurs reprises. Le phénol a été décanté après centrifugation et le culot microbien soumis à une deuxième extraction identique. Les deux surnageants réunis et le culot de centrifugation ont été ensuite soumis à des traitements particuliers.

A. *Fraction I* (phénol-insoluble). Le culot de centrifugation a été débarrassé de toute trace de phénol par quatre lavages successifs à l'éthanol absolu, lavé à l'acétone, desséché sous vide et broyé au mortier. La poudre obtenue est mise en suspension dans de l'eau bidistillée puis laissée à la glacière pendant quarante-huit heures avec agitation mécanique à plusieurs reprises. Après centrifugation et décantation du surnageant, le culot a subi une deuxième extraction identique. Les surnageants réunis, additionnés de 3 p. 100 d'acétate de sodium et refroidis à 0°, ont été versés goutte à goutte dans 2 volumes d'éthanol refroidi à — 10°. Un fin précipité se forme rapidement, est recueilli par centrifugation à froid, lavé à l'éthanol, redissous dans de l'eau bidistillée, centrifugé à 10 000 t/m pendant trente minutes pour éliminer l'insoluble et précipité à nouveau par l'alcool et lavé à l'éther avant d'être desséché sous vide. La purification a été poursuivie par dissolution à raison de 100 mg du produit sec dans 20 ml d'eau bidistillée et addition de 1 ml de chloroforme ; après trois jours à la glacière avec agitation mécanique de une heure chaque jour, on centrifuge la phase aqueuse, on filtre le surnageant sur papier et on procède sur ce filtrat à une deuxième extraction identique par le chloroforme. On précipite les surnageants réunis par l'éthanol à froid en présence d'acétate de sodium comme ci-dessus et on dessèche sous vide.

B. *Fraction II* (phénol-soluble). Les surnageants phénoliques des culots microbiens réunis sont précipités par addition de deux volumes d'éthanol. Le précipité abondant qui se forme aussitôt est lavé trois fois à l'éthanol pour éliminer le phénol puis desséché sous vide après lavage à l'acétone. Après broyage, on dissout la poudre dans de l'eau bidistillée amenée à pH 8 environ par addition de NaOH N/10 et on élimine l'insoluble par centrifugation. La solution est précipitée au voisinage du point isoélectrique (pH 4,1) déterminé par le minimum de solubilité, en ajoutant de l'acide acétique dilué au 1/50. Ce précipité est dissous à pH 8,0 et les mêmes opérations sont répétées encore deux fois. Le dernier précipité, lavé à l'acétone, est desséché sous vide.

Fractionnement de l'antigène cholérique O. Une préparation d'antigène cholérique O (souche *V. cholerae* 569 B), obtenue suivant la technique de l'O. M. S. [43], c'est-à-dire constituée de vibrions soumis à un lavage à l'éthanol et à un chauffage de deux heures et demie à 100° avant leur dessiccation, a été traitée ensuite par le phénol suivant les modalités indiquées ci-dessus.

III. — PRÉPARATION DES ANTISÉRUMS.

1° Chacune des *fractions I et II* de chaque souche, en solution physiologique à pH 7,0 à la teneur de 2 mg/ml, a été injectée par voie intraveineuse à doses croissantes (de 0,1 à 5 ml) à des lapins de 2 à 3 kg à raison de deux injections par semaine. Les animaux ont été saignés sept jours après la dernière dose ayant produit un titre d'anticorps suffisant (agglutination du vibron homologue à un titre égal ou supérieur à 1/2000 pour les sérums anti-I, précipitation au taux minimum de 1/200 pour les sérums anti-II). Le nombre d'injections a varié de 4 à 9 suivant la fraction et la réponse sérologique de l'animal.

Les lapins ont été immunisés soit avec les antigènes non chauffés, soit avec les antigènes chauffés trois heures à 100°.

2° *Les sérums anticholériques de référence* ont été obtenus par injection aux lapins des antigènes Inaba O et Ogawa O de l'O. M. S. [43] jusqu'à obtention d'un titre agglutinant minimum de 1/2 000.

3° *Sérums saturés*. Les sérums anti-fraction II chauffés à 100° ont été saturés par des fractions II hétérologues (non chauffées). Pour ce faire, on a mélangé à volumes égaux le sérum anti-II pur et une solution isotonique à pH 7,0 de fraction II contenant un excès de cette fraction par rapport à la zone d'équivalence déterminée au préalable par la courbe de dosage des anticorps : soit environ 5 mg de fraction II pour un millilitre de sérum. Les sérums de référence choléra O Inaba et Ogawa ont été saturés dans les mêmes proportions. Les mélanges sont portés à 37° pendant trois heures puis à + 4° pendant quarante-huit heures, avec agitation à plusieurs reprises. On a vérifié que les sérums saturés n'agglutinent plus, à la dilution de 1/50, les hématies tannées sensibilisées par la fraction II saturante.

IV. — RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

1° *Recherche des précipitines*. La méthode qualitative a été employée par la technique du disque (*ring test*) après séjour d'une heure au bain-marie à 37°. La méthode quantitative a été pratiquée suivant la technique néphélométrique que nous avons utilisée précédemment pour l'étude immunochimique de *V. fœtus* [46].

2° *Recherche des agglutinines*. Ces anticorps ont été mis en évidence sur les vibrions, récoltés sur gélose peptonée après dix-huit heures de culture à 37°, soit extemporanément sur lame avec les immunsérums dilués à 1/100, soit après vingt-quatre heures à 52° en tubes à des dilutions de sérum croissantes à partir de 1/100. Les vibrions du groupe cholérique et El Tor ont été utilisés vivants ; les vibrions NAG ont été utilisés vivants et également après avoir été chauffés trois heures à 100°.

3° *Recherche des hémagglutinines*. Les hématies de mouton utilisées dans ces tests ont été sensibilisées par les antigènes soit directement, soit après tannage. Dans le premier cas la technique employée a été celle de Middlebrook et Dubos [48], dans le second cas celle de Boyden [49].

RÉSULTATS

I. — CARACTÈRES DES FRACTIONS.

Les *fractions I* se présentent à l'état sec sous forme d'une poudre blanche ; dissoutes en eau physiologique à pH 7,0, elles fournissent des solutions opalescentes dès la teneur de 1 mg/ml. Ces solutions donnent une réaction de Molisch positive mais ne donnent aucune réaction des protéides.

Les *fractions II* se présentent à l'état sec sous forme d'une poudre brunâtre plus ou moins foncée ; leurs solutions en eau physiologique à pH 7,0 sont limpides, plus ou moins colorées

en brun suivant leur teneur ; elles fournissent les principales réactions des protéides (biuret, Millon, xantho-protéique) ; par contre, la réaction de Molisch est toujours négative.

II. — TENEUR DES CORPS MICROBIENS EN FRACTIONS I ET II.

Le tableau I indique pour chaque souche les poids secs des vibrions utilisés et de chacune des deux fractions extraites, avec leur pourcentage par rapport au poids total des corps microbiens.

TABLEAU I. — Teneur des corps microbiens en fractions I et II.

Groupe	Souche	Poids sec	Fraction I		Fraction II	
		mg	mg	%	mg	%
V. cholerae	569B	4930	124	2,7	2170	44,0
	99	5700	58	1,0	1577	27,6
	El Kourein	6600	174	2,6	2080	31,3
	41	5600	164	2,9	2120	37,8
	23	8000	278	3,4	2510	31,3
	112	6270	115	1,8	3410	54,3
	1046	5620	359	6,3	1970	35,0
	Shanghai 3	5160	140	2,7	1722	33,3
V. El Tor	Tor 4	3734	115	3,0	585	15,6
	14	5260	78	1,4	1980	37,6
	47	1620	57	3,5	333	20,5
	Mak 676	5155	138	2,6	1621	31,4
	757	9450	203	2,1	2161	22,8
	770	3491	88	2,5	516	14,8
Vibrions NAG	Ea2ci	4355	230	5,3	1002	23,1
	Bu5	5900	249	4,2	1704	28,8
	Ez5cp	6220	242	3,8	2146	34,1
	1	6362	280	4,4	2030	31,9
	46	7639	733	9,5	1166	15,1
	391	7588	104	1,3	2841	37,3
	418	6314	111	1,7	2958	46,8
	419	5028	96	1,9	1454	28,9
	517	5031	97	1,9	1731	34,4
	526	6600	34	0,5	1120	18,3
	532	2740	105	3,6	1163	42,4
	527	4326	67	1,5	1872	43,2
	535	4696	232	4,9	2149	45,7
	548	3661	23	0,6	1677	45,8
	582	4370	67	1,5	1391	31,8
Antigène choléra O Inaba		3300	15	0,45	879	26,4

Il ressort de ces chiffres que : a) la teneur moyenne en fraction I est de 2,75 p. 100 pour les 14 vibrions « agglutinables » (minimum, 1,0 maximum 6,3) et de 3,3 p. 100 pour les vibrions NAG (minimum 0,5 ; maximum, 9,5) ; b) la teneur moyenne en fraction II est de 33,6 p. 100 pour les vibrions « agglutinables » (minimum, 14,8 ; maximum, 54,3) et de 31,4 p. 100 pour les vibrions NAG (minimum, 15,1 ; maximum, 46,8).

Il n'existe donc aucune différence quantitative significative dans

les compositions respectives des vibrions du groupe cholérique d'une part et des vibrions NAG d'autre part.

Notons que la préparation d'antigène cholérique O, d'un poids de 3 300 mg, a fourni 15 mg de fraction I (0,45 p. 100) et 879 mg de fraction II (26,6 p. 100). Les rendements en fraction I et II des vibrions chauffés à 100° sont donc inférieurs à ceux des vibrions de la même souche (*V. cholerae* 569B) fractionnés directement sans chauffage préalable (respectivement 2,7 et 44,0 p. 100).

III. — RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

1° Antisérums des fractions I.

a) *Précipitines*. — A l'épreuve du disque, les antisérums des fractions I (non chauffées ou chauffées à 100° pendant trois heures) extraites des vibrions cholériques et El Tor précipitent tous non

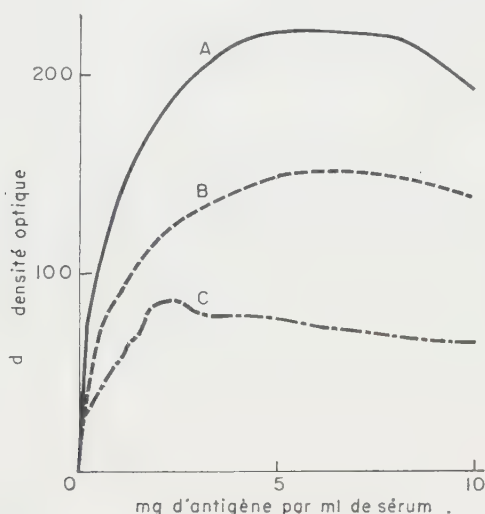


FIG. 1. — Dosage des anticorps d'un sérum anti-fraction I cholérique (Shanghai 3) avec différentes fractions I cholériques et El Tor. Courbe A : *V. cholerae* Shanghai 3 et 41. Courbe B : *V. cholerae* 569 B, 99, *El Kourein*, 23 et 112 ; *V. El Tor* T 4 et M 770. Courbe C : *V. cholerae* 1046, *V. El Tor* T 14, M 676 et M 757.

seulement leur fraction homologue, mais aussi les fractions I croisées de tous les vibrions agglutinables par le sérum cholérique O. Ils ne précipitent pas les fractions I extraites des vibrions NAG. Quant aux antisérums des fractions I extraites des vibrions NAG (chauffées ou non), ils précipitent leur fraction homologue et quelquefois les fractions I d'autres vibrions NAG,

à celui-ci. Sauf une exception (sérum 569 B/I), ils n'agglutinent pas les vibrions NAG.

Nous avons vérifié en outre que les sérums anti-fraction I cholérique n'agglutinent pas les suspensions des vibrions NAG *chauffés* trois heures à 100°.

Les agglutinations des sérums anti-fraction I NAG, toujours négatives avec les vibrions du groupe cholérique-El Tor, sont très variables avec les vibrions NAG eux-mêmes.

Le tableau II indique les résultats des épreuves d'agglutination pratiquées sur lame à la dilution de 1/100 adoptée par l'O. M. S. pour le diagnostic de *V. cholerae* au moyen du sérum cholérique O.

Outre la spécificité du groupe cholérique, les fractions I des vibrions agglutinables par le sérum cholérique O possèdent la spécificité du type (Inaba, Ogawa ou Hikojima) dont elles sont extraites. Le tableau III montre que les sérums anti-fraction I cholérique saturés par les vibrions du type hétérologue (sérum anti-fraction Inaba saturé par des vibrions Ogawa et *vice versa*) se comportent comme les antisérums des préparations internationales de référence saturés dans les mêmes conditions.

TABLEAU III. — Spécificité de type des fractions I extraits de *V. cholerae* Inaba, Ogawa et Hikojima.

IMMUNISÉRUMS			Agglutination de <i>V. cholerae</i> (1)		
Nature de l'antigène	Saturation par	Facteurs O	569 B Inaba	41 Ogawa	1046 Hikojima
Choléra O Inaba (2)	V. Ogawa	C	+	-	+
Fraction I de V. 569B	V. Ogawa	C	+	-	+
Choléra O Ogawa (2)	V. Inaba	B	-	+	+
Fraction I de V. 41	V. Inaba	B	-	+	+
Fraction I de V. 1046	V. Ogawa	C	+	-	+
Fraction I de V. 1046	V. Inaba	B	-	+	+
(1) Agglutination sur lame immédiate à la dilution de 1/100.					
(2) Antigènes choléra O Inaba et Ogawa lyophilisés (préparations internationales de référence de l'OMS).					

c) *Hémagglutinines*. — La nature polysidique des fractions I nous a fait utiliser d'abord les hématies non tannées (à des pH variables de 6,4 à 7,2). Dans ces conditions, nous avons obtenu quelques résultats positifs avec des antisérums de fractions I *non chauffées* (hémagglutination des érythrocytes, sensibilisés par la fraction I homologue non chauffée, à des taux compris entre 1/500 et 1/4000), mais une grande proportion des résultats ont été

négatifs. Le procédé de tannage des hématies avant leur sensibilisation par la fraction I nous a donné alors des résultats positifs de même valeur pour quelques-unes des fractions ayant donné des résultats négatifs par la première technique.

Dans l'ensemble, ces réactions sont trop irrégulières pour que nous puissions en tirer des conclusions valables, en particulier pour les réactions croisées. Par contre, il ne nous a jamais été possible de démontrer la présence d'hémagglutinines dans les sérums anti-fraction I *chauffées trois heures à 100°*, vis-à-vis des hématies sensibilisées (tannées ou non) par les fractions I chauffées à 100°.

2° Antisérums des fractions II non chauffées.

a) *Précipitinés.* — A l'épreuve du disque les antisérums des fractions II précipitent tous non seulement leur fraction homologue, mais aussi les fractions II de tous les vibrions étudiés dans ce

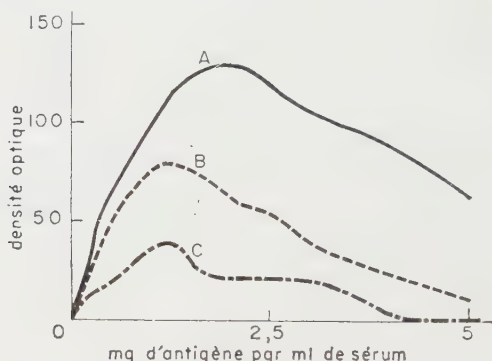


FIG. 2. — Dosage des anticorps d'un sérum anti-fraction II (vibron NAG-Ez5cp) avec différentes fractions II de vibrions du groupe cholérique-El Tor et de vibrions NAG.

travail, agglutinables ou non par le sérum cholérique O. D'une manière générale, les sérums anti-fraction II ne précipitent pas les fractions I.

Les *dosages quantitatifs* croisés fournissent des courbes d'anticorps qui ne sont pas toujours superposables, mais qui ne permettent pas de différencier les fractions II du groupe cholérique de celles du groupe NAG. A titre d'exemple, la figure 2 représente les courbes des anticorps d'un sérum anti-fraction II (extraite du vibron d'eau Ez5cp) pour la fraction homologue et pour 15 autres fractions II provenant de *V. cholerae* (8 fractions), de *V. El Tor* (4 fractions) et de vibrions NAG (4 fractions). Les

points fournis par les 16 dosages se répartissent sur trois courbes principales : A, B et C. Sur la courbe A, la plus haute, figurent les points correspondant aux fractions II extraites du vibron homologue (Ez5cp), d'un autre vibron d'eau (Eu5) et de 4 *V. cholerae* (569 B, 23, 41 et 1046) ; sur la courbe B, immédiatement inférieure, se situent les points des dosages pour les fractions II provenant d'un *V. cholerae* (99) et de 3 *V. El Tor* 4, Makassar 676 et 757) ; enfin, sur la courbe C, la plus basse, on trouve les points des dosages des fractions II de 2 vibrions NAG (Ea2ci et 46), de 3 *V. cholerae* (El Kourein, 112 et Shanghai 3) et d'un *V. El Tor* (Tor 14).

Les dosages effectués avec d'autres antisérums de fractions II extraites soit de vibrions cholériques, soit de vibrions d'El Tor, ont fourni également des courbes pouvant se ramener à quelques tracés communs mais, dans chaque cas, la répartition des fractions correspondant au même tracé a montré qu'il n'existait pas de courbe de précipitation caractéristique des vibrions « agglutinables » ou des vibrions NAG exclusivement.

b) *Agglutinines*. — Les sérums anti-fraction II n'agglutinant pas leur vibrions homologues, la recherche des agglutinations croisées est donc ici sans objet.

c) *Hémagglutinines*. — Les hématies, à condition d'être tannées au préalable, sont toujours sensibilisées par les solutions de fractions II ; elles sont alors agglutinées à des titres très élevés (parfois jusqu'à 1/2 000 000) par le sérum homologue aussi bien que par les sérums croisés. Les taux d'agglutination croisée obtenus avec les différents antisérums II et les hématies sensibilisées par différentes fractions II atteignent souvent les titres homologues. Les réactions négatives (titre inférieur à 1/100) sont absolument exceptionnelles : nous n'en avons relevé que 2 sur un total de 576 (0,34 p. 100). Nous n'avons pas fait figurer les résultats de ces hémagglutinations directes et croisées sur un tableau spécial qui, étant donné le nombre de ces réactions et la constance de leurs résultats, n'offrirait qu'un intérêt réduit.

Divers échantillons de fractions II, en solution physiologique à 5 mg par millilitre, ont été soumis à des chauffages différents (soit trois heures à 56°, dix minutes à 100° et trois heures à 100°) avant d'être mis en contact avec les hématies tannées. Ces solutions dont la limpidité n'est pas modifiée par le chauffage, donnent avec la même intensité qu'avant celui-ci les réactions des protéides. Les taux d'hémagglutination obtenus avec les hématies sensibilisées par les fractions II chauffées trois heures à 56° ne sont jamais inférieurs aux taux obtenus avec les mêmes fractions non chauffées et leur sont même souvent supérieurs. L'action de la chaleur à 100° se traduit généralement par une baisse du titre,

légère après dix minutes de chauffage, plus marquée après trois heures, mais on a pu, là aussi, constater quelques résultats inverses.

L'effet du chauffage sur la fraction II a été noté particulièrement dans le cas de *V. cholerae* et de *V. El Tor* : sur le tableau IV figurent quelques résultats d'hémagglutinations directes et croisées concernant ces deux variétés de vibrions. On voit que les réactions croisées, bien que souvent diminuées comme les réactions homologues, restent toujours positives et ne permettent donc pas de différencier, par leur thermosensibilité, les fractions II des *V. cholerae* de celles des *V. El Tor*, alors qu'on sait que le chauffage des vibrions eux-mêmes (à 56° pendant trois heures) fait apparaître des différences dans leur agglutinabilité par un sérum anticholérique (Gispen, 1935).

TABLEAU IV. — Titres des hémagglutinations suivant chauffage des fractions II du groupe cholérique et El Tor avant la sensibilisation des hématies.

Fraction II	Chauffage	Antisérums Fraction II			
		V. cholerae		V. El Tor	
		569B	Sh 3	T 4	M 757
569B	néant	40.000	40.000	40.000	40.000
	3h à 56°	40.000	40.000	200.000	100.000
	10m à 100°	4.000	10.000	20.000	20.000
	3h à 100°	4.000	4.000	4.000	4.000
Shanghai 3	néant	20.000	200.000	40.000	10.000
	3h à 56°	20.000	200.000	100.000	40.000
	10m à 100°	10.000	220.000	10.000	10.000
	3h à 100°	8.000	100.000	4.000	4.000
Tor 4	néant	1.000	40.000	40.000	5.000
	3 h à 56°	2.000	40.000	40.000	4.000
	10 m à 100°	500	4.000	4.000	1.000
	3 h à 100°	200	400	400	200
Makassar 757	néant	2.000	20.000	20.000	20.000
	3 h à 56°	4.000	100.000	20.000	40.000
	10 m à 100°	1.000	10.000	4.000	4.000
	3 h à 100°	400	4.000	4.000	4.000

Indiquons, d'autre part, que la fraction II extraite de l'antigène cholérique O (c'est-à-dire des vibrions ayant subi un chauffage préalable de trois heures à 100° avant l'extraction phénolique) se comporte avec les sérums anti-II comme la fraction II extraite des vibrions de même souche, c'est-à-dire que les taux d'hémagglutination des érythrocytes sensibilisés par l'une ou l'autre de ces deux préparations sont les mêmes.

3° Antisérums des fractions II chauffées trois heures à 100°.

Les antisérums des fractions II chauffées à 100° pendant trois heures précipitent les fractions II homologues à des dilutions sensiblement égales à celles des immunosérums des fractions II non chauffées. Comme ceux-ci, ils agglutinent les hématies tannées sensibilisées par la fraction II homologue non chauffée ou chauffée à 100°. Les taux d'hémagglutination sont compris respectivement entre 1/10 000 et 1/100 000 et entre 1/500 et 1 4 000. Les hémagglutinations croisées sont également positives dans tous les cas (antisérums des fractions II chauffées extraites du groupe V. *cholerae*-

TABLEAU V. — Titres agglutinants des sérums cholériques O et des antisérums des fractions II chauffées trois heures à 100°, pour les hématies sensibilisées avec les fractions II des 29 vibrions étudiés.

Fractions II extraites de	Sérums de référence cholera O		Sérums anti-fractions II chauffées 3 heures à 100°							
	Inaba	Ogawa	- V. cholerae - 569 B	23	Vibrions N A G					
			Inaba	Ogawa	Bu 5 eau	46 Tortue	391 Crapaud	535 Huitre	582 Crabe	
<u>V. cholerae</u>										
569B	20.000	4.000	40.000	10.000	2.000	5.000	2.000	5.000	5.000	
99	5.000	1.000	4.000	2.000	1.000	2.000	2.000	2.000	2.000	
El Kourein	20.000	5.000	2.000	2.000	500	1.000	500	500	200	
41	5.000	1.000	4.000	1.000	1.000	500	1.000	1.000	2.000	
23	10.000	5.000	15.000	10.000	2.000	500	1.000	2.000	1.000	
112	10.000	2.000	10.000	10.000	2.000	500	1.000	1.000	500	
1046	10.000	2.000	2.000	1000	2.000	500	1.000	1.000	2.000	
Shanghai 3	5.000	5.000	10.000	10.000	4.000	2.000	2.000	2.000	2.000	
<u>V. El Tor</u>										
T 4	2.000	5.000	1.000	2.000	2.000	100	1.000	1.000	2.000	
T 14	20.000	40.000	40.000	20.000	10.000	10.000	5.000	10.000	20.000	
T 47	10.000	4.000	4.000	1.000	500	200	200	200	200	
M 676	800	200	400	200	1.000	200	200	200	200	
M 757	10.000	11.000	40.000	1.000	1.000	500	500	500	500	
M 770	200	1.000	1.000	500	4.000	50	500	1.000	20	
<u>V. NAG</u>										
Ba2ci	1.000	2.000	2.000	1.000	2.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
Bu5	20.000	4.000	40.000	20.000	20.000	20.000	5.000	20.000	10.000	
Bz5ep	10.000	4.000	5.000	2.000	2.000	500	5.000	2.000	1.000	
1	200	500	1.000	500	1.000	5.000	500	2.000	500	
46	2.000	2.000	1.000	4.000	200	40.000	20.000	20.000	20.000	
391	2.000	2.000	2.500	2.000	20.000	400	20.000	20.000	20.000	
526	10.000	1.000	4.000	2.000	10.000	10.000	2.000	5.000	2.000	
535	4.000	1.000	2.000	2.000	2.000	2.000	5.000	20.000	1.000	
582	1.000	500	25.000	1.000	200	1.000	2.000	5.000	40.000	
418	200	400	4.000	4.000	4.000	500	10.000	20.000	10.000	
419	100	40	2.000	4.000	2.000	200	2.000	10.000	4.000	
517	1.000	1.000	2.000	2.000	4.000	2.000	10.000	1.000	4.000	
527	5.000	2.000	5.000	2.000	10.000	10.000	4.000	5.000	10.000	
532	1.000	200	2.000	2.000	4.000	4.000	4.000	10.000	20.000	
548	500	200	2.000	1.000	10.000	1.000	2.000	4.000	4.000	

V. *El Tor* avec hématies sensibilisées par les fractions II extraites des vibrions NAG et vice versa).

Sur le tableau V (colonnes 3 et suivantes) sont indiqués les

résultats des hémagglutinations de sept sérums anti-fraction II chauffées extraites de deux *V. cholerae* (Inaba 569 B et Ogawa 23) et de cinq vibrions représentatifs du groupe NAG (eau, tortue, crapaud, huitre et crabe) avec les érythrocytes sensibilisés par les fractions II extraites des 29 vibrions étudiés dans ce travail.

4° Sérums cholériques de référence (Inaba et Ogawa).

L'action de ces sérums a été étudiée vis-à-vis de chacune des fractions I et II des 29 vibrions.

a) *Précipitines*. — Les sérums cholériques O se comportent vis-à-vis de la fraction I comme les antisérums des fractions I extraites des vibrions du groupe cholérique-El Tor. Par contre, ces sérums cholériques O précipitent indistinctement les fractions II de tous



FIG. 3. — Dosage des anticorps d'un sérum cholérique O (Ogawa) avec les fractions I cholérique (courbe A), II cholérique (Courbe B) et II NAG (courbe C).

les vibrions « agglutinables » ou NAG. En effet, les dosages quantitatifs montrent qu'il existe dans ces sérums non seulement des anticorps précipitant la fraction I cholérique, mais aussi des anticorps précipitant les fractions II, cholérique et NAG. La figure 3 montre un exemple des courbes de dosage d'un sérum cholérique O avec une fraction I de *V. cholerae* (1046) et deux fractions II extraites l'une du même vibron cholérique, l'autre d'un vibron NAG (Ez5cp).

Il ressort de cette figure que : a) les tracés des deux courbes correspondant respectivement aux fractions I et II du vibron cholérique diffèrent nettement, les sommets ne sont pas à la même hauteur et sont fortement décalés sur la ligne des abscisses ;

b) les tracés des dosages des fractions II du vibron cholérique et vibron NAG sont très voisins, leur allure générale est la même et leur maximum se situe au même point de la ligne des abscisses.

b) *Hémagglutinines*. — L'utilisation de la réaction d'hémagglutination passive permet de confirmer les résultats non spécifiques précédents. On constate, en effet, que les sérums cholériques O agglutinent constamment à des taux significatifs les hématies sensibilisées par les fractions II *sans discrimination*, c'est-à-dire aussi bien les fractions II extraites du groupe *V. cholerae* et *V. El Tor* que celles provenant des vibrions NAG. Les titres d'hémagglutination sont toutefois un peu moins élevés que ceux fournis par les sérums anti-fraction II : ils ne dépassent guère 1/20 000. Le tableau V (colonnes 1 et 2) indique les résultats fournis par les deux sérums cholériques O Inaba et Ogawa avec des hématies sensibilisées par les fractions II des 29 vibrions étudiés.

5° *Sérums cholériques O et antisérums des fractions II chauffées saturés par les fractions II hétérologues.*

Les sérums cholériques O de référence et les antisérums des fractions II chauffées trois heures à 100° ont été saturés par des fractions II hétérologues (non chauffées) suivant la technique indiquée plus haut. Après saturation ces sérums ont été mis en présence des hématies sensibilisées par diverses fractions II. Dans le tableau VI figurent les résultats des hémagglutinations obtenues avec les deux sérums cholériques Inaba et Ogawa et avec sept antisérums de fractions II extraites respectivement de deux *V. cholerae* (Inaba et Ogawa) et de cinq vibrions NAG (eau, tortue, crapaud, huître et crabe).

Ces résultats font immédiatement apparaître l'hétérogénéité de la fraction II extraite des divers vibrions, en même temps qu'on retrouve dans les sérums cholériques O (anti-vibrions totaux) la complexité des hémagglutinines II des sérums préparés par injection aux animaux de la fraction protéidique seule.

A première vue, les sérums cholériques O et les antisérums des fractions II des *V. cholerae* se comportent, après saturation par les fractions hétérologues, d'une manière presque identique. De même, les antisérums des fractions II extraites des quatre vibrions isolés des animaux aquatiques présentent un grand nombre de points communs. Le vibron isolé de l'eau a une fraction II d'un comportement plus particulier.

L'analyse des résultats complets a montré qu'il existait au moins 10 facteurs antigéniques différents chez les 29 vibrions étudiés. Certains de ces facteurs se comportent en haptènes. En attribuant

TABLEAU VI. — Titres hémagglutinants des sérums anticholériques O et des sérums anti-fraction II saturés par des fractions II hétérologues.

SÉRUM ANTI-		saturé par F/II	F R A C T I O N S I I							
			- V.cholerae -		Vibrions			NAG		
			569B	23	Eu5	T	46	391	535	582
Choléra O	569B		0	1000	1000		0	0	0	0
Inaba	23		0	0	0		0	0	0	0
	Eu5		1000	1000	0		0	0	0	0
	46		5000	2000	2000		0	0	200	0
	391		5000	2000	2000		0	0	0	0
	535		500	2000	2000		0	0	0	0
Choléra O	569B		0	500	1000		200	0	200	0
Ogawa	23		0	0	0		0	0	200	0
	Eu5		200	500	0		0	0	200	0
	46		2000	2000	5000		0	0	200	0
	391		2000	2000	2000		0	0	0	0
	535		2000	2000	2000		0	0	0	0
569B/II	23		1000	0	0		0	0	0	0
	Eu5		5000	500	0		400	2000	2000	400
	46		5000	2000	250		0	0	0	0
	391		5000	2000	200		0	0	0	0
	535		5000	2000	400		0	0	0	0
	582		5000	1000	0		0	0	0	0
23/II	569B		0	0	0		0	0	0	0
	Eu5		0	0	0		0	0	0	0
	46		2000	1000	2000		0	0	200	0
	391		1000	1000	1000		0	0	0	0
	535		500	2000	1000		0	0	0	0
	582		2000	2000	2000		0	0	0	0
Eu5/II	569B		0	0	2000		0	0	0	0
	23		0	0	2000		0	0	0	0
	46		10000	2000	2000		0	400	2000	2000
	391		5000	2000	2000		0	0	0	0
	535		5000	2000	1000		0	0	0	0
	582		5000	2000	2000		0	0	0	0
46/II	569B		0	0	0		4000	2000	5000	5000
	23		0	0	0		2000	2000	2000	2000
	Eu5		0	0	0		1000	2000	500	1000
	391		0	0	0		0	0	0	0
	535		0	0	0		0	0	0	0
	582		0	0	0		0	0	0	0
391/II	569B		0	0	0		0	1000	200	200
	23		0	0	0		0	1000	200	200
	Eu5		0	0	0		0	1000	200	200
	46		0	0	0		0	2000	0	0
	535		0	0	0		0	2000	0	0
	582		0	0	0		0	2000	0	0
535/II	569B		0	0	0		200	1000	200	200
	23		0	0	0		1000	2000	500	2000
	Eu5		500	0	0		200	2000	200	200
	46		200	0	0		0	200	100	200
	391		0	0	0		0	0	200	0
	582		0	0	0		0	0	0	0
582/II	569B		0	0	0		0	1000	500	500
	23		0	0	200		1000	2000	2000	2000
	Eu5		200	0	0		200	500	1000	1000
	46		0	0	0		0	0	1000	100
	391		0	0	0		0	0	1000	100
	535		0	0	0		0	0	0	0

à ces facteurs les lettres minuscules *a, b, c...* (pour éviter la confusion avec les majuscules *A, B, C...* réservées aux facteurs *O* classiques, et les chiffres 1, 2, 3... attribués par Burrows et coll. [8] aux facteurs thermolabiles *H*) et en admettant que le facteur commun *a* se retrouve chez tous les vibrions, on pourrait fixer à chacune des 29 souches étudiées les formules suivantes :

V. cholerae :

569 B	abcdeg
99	ae
El K.	aeg
41	ae
23	acdeg
112	ae
1046	aeg
Sh. 3	acdefg

V. El Tor :

T 4	aef
T 14	abcdefg
T 47	adef
M 676	af
M 737	abcdeg
M 770	acdef

Vibrions d'eau :

Ea2ci	abe
Eu5	aefg
Ez3cp	ae

Vibrions d'animaux :

1	aef
46	adh
391	adghi
418	ahj
419	aj
517	abfghi
526	abghi
527	abg
532	ag
535	adghi
548	abfghi
582	adghi

DISCUSSION.

1° FRACTION I.

a) Les résultats des épreuves sérologiques auxquelles ont été soumises les fractions I extraites de 8 souches de *V. cholerae* et de 6 souches de *V. El Tor* par la méthode au phénol, déjà utilisée par Shrivastava et coll. [47] pour l'isolement du polyoside cholérique, confirment les conclusions de ces auteurs. En effet, nous avons trouvé comme eux que ces fractions polyosidiques possèdent la spécificité de l'antigène cholérique *O* en ce qui concerne les agglutinogènes actifs sur les vibrions *vivants* du sous-groupe *O I* exclusivement (tableau II). En outre, nous avons vu que les fractions I cholériques ne contiennent pas d'antigène *O* non spécifique de Gardner et Venkatraman puisque les sérums anti-I n'agglutinent pas les vibrions NAG *chauffés* à 100°. La fraction I cholérique est donc antigéniquement distincte des fractions I extraites des vibrions NAG.

Nous avons montré, en outre, que les fractions I cholériques possèdent la spécificité du type (Inaba, Ogawa ou Hikojima) du *V. cholerae* dont elles proviennent (tableau III). Indiquons, à ce sujet, que Shrivastava, dans une communication récente [20], a signalé qu'il n'avait pas observé de différence dans les préparations provenant des deux types et il a attribué ce fait à une dégradation possible des polyosides au cours de leur préparation ou

à « quelque différence dans les fractions protéidiques ». La seconde interprétation doit, à notre avis, être écartée d'après l'étude que nous avons faite de la fraction II : il n'y a pas de différences significatives entre les fractions protéidiques des vibrions Inaba, Ogawa ou Hikojima. Nous estimerons donc que la technique de préparation que nous avons employée n'a pas entraîné de dégradation du polyside puisque celui-ci a conservé la spécificité des agglutinogènes du vibron total.

En outre, le fait que la fraction I extraite de l'antigène cholérique O a le même comportement que la fraction I extraite directement des mêmes vibrions non chauffés indique que les agglutinogènes de la fraction polysidique de *V. cholerae*, chauffée ou non, sont identiques aux agglutinogènes *spécifiques* de l'antigène cholérique O de Gardner et Venkatraman.

Les différences observées dans les courbes de précipitation d'un antisérum de fraction I d'un type donné (par exemple Inaba) avec les fractions I extraites de vibrions du même type mais de souches différentes donnent à penser qu'il existe dans la fraction polysidique des facteurs O *précipitinogènes* qui ne correspondent pas strictement aux facteurs cholériques O *agglutinogènes* classiques (A, B, C). Ces faits sont illustrés par l'exemple de la figure 1 sur laquelle on peut voir que la répartition des anticorps d'un sérum anti-I Hikojima, qui correspondent à 13 fractions I cholériques ou El Tor de types divers, se fait suivant trois tracés principaux, communs chacun à plusieurs fractions, mais dont aucun ne comprend exclusivement les fractions I d'un seul des trois types cholériques classiques.

b) *Quant aux fractions I des vibrions NAG*, elles s'avèrent hétérogènes. Les résultats du tableau II montrent que les rapports sérologiques entre les polysides de vibrions de même origine ne sont pas très nets. Si l'on met à part les fractions I des trois vibrions isolés chez des crapauds (391, 418 et 419), qui ont un comportement presque identique, on voit qu'il est impossible de classer ces fractions dans des groupes correspondants aux sous-groupes O non cholériques de Gardner et Venkatraman. Il est, néanmoins, possible qu'une étude portant sur un plus grand nombre de souches NAG permette une telle classification.

c) Indiquons enfin que le fait que les antisérums des fractions I agglutinent les vibrions confirme que ces fractions se situent à la surface des corps microbiens.

d) Les réactions d'héماغglutination des sérums anti-I, irrégulières avec les hématies sensibilisées par les fractions I *non chauffées* et constamment négatives avec ces mêmes fractions *chauffées* à 100°, indiquent, comme on y reviendra plus loin, la persistance dans certaines fractions polysidiques de traces de la fraction pro-

téidique. La négativation de ces réactions après chauffage de la fraction I impure s'explique par la réduction partielle, constatée par ailleurs, du pouvoir hémagglutinogène du protéide II après chauffage à 100° pendant trois heures. Le titre de ces réactions parasites n'étant jamais très élevé, le chauffage suffit pratiquement à les faire disparaître. On peut donc en conclure que les fractions I pures ne sont pas hémagglutinogènes.

2° FRACTION II.

La mise en évidence de précipitines et d'hémagglutinines communes dans les antisérums des fractions II non chauffées démontre qu'il existe une parenté antigénique entre les fractions protéidiques de tous les vibrions étudiés dans ce travail : *V. cholerae*, *V. El Tor* et vibrions NAG.

De plus, on a constaté d'une part que ces fractions chauffées à 56° ou à 100° conservaient leur aptitude à sensibiliser les hématies en donnant des réactions d'hémagglutination comparables à celles obtenues avant chauffage (en particulier ne permettant pas de différencier les fractions protéidiques de *V. cholerae* de celles de *V. El Tor*), et d'autre part on a obtenu avec les antisérums des fractions II chauffées trois heures à 100° des résultats qui, compte tenu d'un affaiblissement général des titres, sont identiques à ceux fournis par les antisérums des mêmes fractions non chauffées. Cet antigène commun aux vibrions du groupe cholérique et aux vibrions NAG est donc une protéine thermostable.

L'existence d'un telle protéine de *V. cholerae* est déjà connue : il y a une vingtaine d'années Bruce White [21], au cours de ses études poussées sur les antigènes cholériques, avait signalé l'existence d'un antigène protidique somatique thermostable (*heat stable somatic protein* ou HSSP), résistant à un chauffage « d'une demi-heure à une heure au bain-marie bouillant », qu'il avait extrait en traitant par le chloroforme des suspensions de jeunes cultures de vibrions cholériques en eau physiologique. Pour « faciliter l'extraction », White utilisait de préférence des cultures R et g, mais il a précisé qu'on trouvait ce même antigène HSSP dans les vibrions S. Cependant, les préparations de HSSP de White ne semblent pas avoir été constituées essentiellement de protéines : en effet, si elles donnaient bien les réactions de ces substances, elles fournissaient aussi des réactions de Molisch « fortement positives ». Ces dernières furent attribuées à la présence, dans le HSSP, d'un haptène polyosidique (dénommé Cy) que White avait mis en évidence en détruisant dans ce complexe, par digestion protéolytique, la protéine elle-même.

Plus récemment (1957), Burrows [22] a utilisé une méthode de fractionnement de *V. cholerae*, faisant appel à des procédés phy-

siques, qui lui a permis d'isoler deux fractions thermostables : l'une représentant la membrane cellulaire (*cell-wall substance* ou CW), l'autre la substance intracellulaire (*intracellular substance* ou IC) du vibrion. Ces deux fractions contiennent l'une et l'autre, bien qu'en proportions différentes, les deux sortes de substance que l'on sait exister dans les vibrions : polyoside(s) et protéine(s). CW contient 60 p. 100 de polyoside et 30 p. 100 de protéine, IC 15 p. 100 de polyoside et 30 p. 100 de protéine. Les deux fractions de Burrows ne peuvent donc être considérées comme chimiquement distinctes, ce qui ne saurait étonner vu la technique de leur préparation.

Cependant, malgré la complexité des substances précitées, les conclusions de l'étude sérologique du HSSP de White d'une part, comme celles émises par Burrows et Schlub [23] à la suite de leurs expériences d'hémagglutination passive au moyen de CW et IC d'autre part, fournissent des points de comparaison particulièrement intéressants pour discuter nos propres résultats.

White a indiqué que son sérum anti-HSSP flocculait non seulement avec les extraits de *V. cholerae* S mais aussi avec ceux de nombreux autres vibrions non cholériques. Nos réactions de précipitation montrent que les antisérums de nos fractions II isolées des vibrions cholériques ou NAG possèdent tous cette même propriété.

D'autre part, White signale que le sérum anti-HSSP n'agglutine pas *V. cholerae* ; ce qui, dit-il, indiquerait que la fraction HSSP appartient à la substance profonde du vibrion. Si nos expériences confirment la non-agglutination des vibrions par les sérums anti-fraction II, par contre nos résultats positifs d'agglutination des hématies, sensibilisées par la fraction II, sous l'influence du sérum cholérique O, semblent montrer que cette fraction (si elle s'identifie, comme on peut le croire, à la substance HSSP privée du polyoside C γ) est en réalité moins profonde que ne le pensait White. En effet, les vibrions totaux chauffés à 100°, qui servent à préparer le sérum cholérique O, conservent leur intégrité morphologique ; ce chauffage n'entraîne donc pas de libération de la substance protidique comme le ferait une rupture du corps microbien qui pourrait expliquer la formation d'anticorps par une fraction exclusivement intracellulaire à l'origine. On peut, évidemment, supposer qu'un tel clivage du vibrion intact se produit *in vivo* chez l'animal immunisé, mais il nous paraît plus simple et plus vraisemblable de penser qu'une partie au moins de cette substance protéidique, la plus superficielle, est liée à la fraction polysidique.

Cette opinion trouve une première confirmation dans le fait que la fraction CW de Burrows, considérée comme représentant la membrane cellulaire, contient 30 p. 100 de protéine. De plus,

certaines faits d'expérience sont en faveur de la liaison polysideprotéide : en effet, si, par le fractionnement des vibrions, on obtient la fraction II protéidique en un état de pureté sérologique démontrée par l'absence dans le sérum anti-II de précipitines et d'héماغglutinines anti-I homologues, par contre, on constate assez fréquemment qu'il n'en est pas de même pour la fraction I ; certains sérums anti-I, bien que ne précipitant pas la fraction II homologue, agglutinent les hématies sensibilisées par cette fraction II. La réaction d'héماغglutination, très sensible, permet ainsi de déceler dans certaines fractions polysidiques des traces de la fraction protéidique persistant malgré le traitement par le phénol et le chloroforme (4). De ce fait, et en raison de l'absence de spécificité de la fraction II, démontrée par nos expériences, on peut observer des réactions croisées entre certains sérums anti-fraction I de *V. cholerae* et des hématies sensibilisées par des fractions II de vibrions NAG, et vice-versa. Ces résultats qui, pour nous, ne doivent pas être interprétés au détriment de la spécificité réelle du polyside cholérique, témoignent incontestablement d'une liaison assez solide des deux fractions I et II dans le corps du vibron et même à sa surface.

De l'étude des fractions CW et IC provenant de deux souches de *V. cholerae* (Inaba et Ogawa), Burrows et Schlub [23] ont conclu que les antigènes thermostables du vibron cholérique pouvaient être séparés en deux groupes : les antigènes qui participent aux réactions d'absorption des agglutinines, probablement localisés à la surface de la cellule bactérienne et peut-être aussi dans les portions plus profondes de la structure cellulaire, et les antigènes non agglutinogènes, mais héماغglutinogènes pouvant se produire soit dans la membrane cellulaire, soit dans la substance intracellulaire, soit dans les deux.

Les conclusions de Burrows et Schlub nous semblent valables, mais en partie seulement. En effet, elles sont incomplètes : d'une part elles ne mentionnent pas dans le premier groupe les antigènes O non spécifiques, agglutinogènes et thermostables également, qui peuvent être présents dans les vibrions chauffés à 100° ; d'autre part, elles ne font pas état (ce qui est explicable, puisque basées sur l'étude du seul *V. cholerae*) de la non-spécificité des antigènes héماغglutinogènes ; enfin elles ne mentionnent pas les antigènes précipitants.

En ce qui concerne le premier point, rappelons que, selon Gardner et Venkatraman [2], l'existence de l'antigène O commun

(4) Cette persistance du protéide peut expliquer les échecs de la sensibilisation des hématies non tannées par certaines fractions I *non chauffées* qui, en revanche, sensibilisent aisément les érythrocytes après leur tannage.

non spécifique se manifeste, du reste de façon inconstante, par le pouvoir agglutinant du sérum O du sous-groupe I sur les suspensions de vibrions non cholériques ayant subi l'ébullition (ces vibrions vivants étant par définition inagglutinables par ce même sérum). Pour ces auteurs, la réaction O non spécifique pourrait s'expliquer de deux manières : 1° l'antigène flagellaire (H) commun thermolabile serait transformé par le chauffage en un nouvel antigène commun thermostable, ou 2° l'ébullition détruisant l'antigène H ferait apparaître un nouvel antigène commun, inerte dans le vibron vivant. Gardner et Venkatraman ont écarté leur première hypothèse en se basant sur le comportement de souches NAG non mobiles, donc dépourvues d'antigène H, dont les suspensions chauffées réagissent avec le sérum cholérique O comme les souches mobiles et dont les antisérums préparés avec des vibrions non chauffés contiennent cependant les agglutinines O non spécifiques. Ces antigènes non spécifiques, qui sont indépendants de l'antigène H, seraient, selon Gardner et Venkatraman et selon White, les protéines Q (Q_1 et Q_2) isolées par ce dernier auteur [24] par extraction à 45-50° des vibrions avec de l'alcool contenant 5 p. 100 de solution d'HCl normale.

Le rappel de ces notions explique que nos fractions II ne contiennent pas d'antigène Q de par la technique même de leur préparation, qui comporte une précipitation et des lavages à l'éthanol après l'extraction par le phénol. C'est pourquoi les sérums anti-fraction II n'agglutinent pas plus les vibrions chauffés que vivants. En outre, si rien ne s'oppose à ce que les sérums O préparés (comme ceux de Gardner et Venkatraman) par simple chauffage à 100° des vibrions, contiennent les anticorps Q, il n'en est pas de même des sérums cholériques O qui sont obtenus par immunisation des lapins avec les antigènes O Inaba et Ogawa de référence internationale. En effet, les *V. cholerae* qui constituent ces antigènes ont subi, nous l'avons déjà indiqué, un lavage à l'éthanol, précisément dans le but d'éliminer ces antigènes O non spécifiques. Nous avons du reste vérifié, dans ce travail, l'absence d'agglutinabilité des vibrions NAG chauffés à 100° par les sérums de référence. On voit donc qu'à part la non-spécificité, il n'y a aucun rapport entre les hémagglutinations non spécifiques fournies constamment par les sérums choléra O de référence et les agglutinines O également non spécifiques de Gardner et Venkatraman.

Les hémagglutinogènes non spécifiques sont donc le fait d'une fraction protéidique du vibron (indépendante des protéines Q et liée ou non dans le corps du microbe avec la fraction polysidique) qui constitue indiscutablement un antigène thermostable commun à *V. cholerae* et aux vibrions NAG. Cet antigène est complexe : l'analyse faite au moyen des antisérums saturés nous

a montré l'existence d'au moins 10 facteurs antigéniques différents. Les formules que nous avons attribuées aux fractions II des 29 vibrions étudiés n'indiquent pas que certains de ces facteurs soient réservés à *V. cholerae* ou à *V. El Tor* plutôt qu'aux vibrions NAG. Il apparaît, cependant, que l'on n'a trouvé les facteurs *h*, *i* et *j* que dans les vibrions d'origine animale chez lesquels les facteurs *c* et *e* sont au contraire exceptionnels ; mais il serait prématuré de tirer de ces constatations une conclusion quelconque, sur l'examen de 29 souches seulement. On peut, tout aussi bien, y voir une simple coïncidence et estimer que la répartition des facteurs antigéniques de la fraction II des vibrions procède uniquement du hasard.

3° ANTIGÈNE CHOLÉRIQUE O.

Nous avons montré que les deux fractions antigéniques que nous avons extraites des vibrions cholériques et étudiées séparément, sont présentes dans l'antigène cholérique O total (c'est-à-dire dans les mêmes vibrions modifiés par le chauffage) d'où nous les avons également isolées avec des propriétés sérologiques identiques. Cette constatation, tout en confirmant le caractère réel de thermostabilité des fractions I et II, nous a donc permis de comparer les propriétés immunologiques inhérentes à l'antigène O total d'une part, avec l'ensemble des propriétés analogues des deux fractions d'autre part. De cette confrontation, il résulte que toutes les propriétés sérologiques de chacune des fractions I et II se retrouvent identiquement dans l'antigène O ; en effet, nous les avons mises en évidence pour celui-ci dans les mêmes conditions où nous l'avions fait pour chacun des deux éléments antigéniques.

Ceci permet d'attribuer à chaque fraction son rôle particulier dans la production des divers anticorps qu'on peut déceler dans les sérums cholériques O de référence. Ces rôles sont les suivants : le polyoside (fraction I) est à l'origine des agglutinines et des précipitines spécifiques, le protéide (fraction II) est responsable des hémagglutinines et des précipitines non spécifiques.

Tout compte fait, on peut donc dire que, dans la production des anticorps, l'antigène cholérique O se comporte, ni plus ni moins, comme la somme de ses deux éléments antigéniques isolables : ceux-ci donc tout à la fois nécessaires et suffisants.

CONCLUSIONS.

Le fractionnement par la méthode au phénol de 14 vibrions agglutinables par le sérum anticholérique O (*V. cholerae* et *V. El Tor*) et de 15 vibrions non agglutinables par ce même sérum (vibrions isolés des eaux et d'animaux aquatiques) a permis

d'isoler deux fractions antigéniques thermostables (trois heures à 100°), non alcoolo-solubles, distinctes.

L'une (fraction I) est un polyside dont l'antisérum précipite la fraction homologue et agglutine les vibrions homologues. Ses réactions agglutinogènes reproduisent sensiblement les réactions *agglutinogènes* de l'antigène O classique des vibrions. La fraction I extraite des vibrions cholériques et El Tor répond à l'antigène O du sous-groupe I de Gardner et Venkatraman. Son antisérum agglutine exclusivement les vibrions agglutinables par les sérums cholériques O non différentiels de référence internationale. De plus, la fraction I cholérique ou El Tor possède la spécificité du type (Inaba, Ogawa ou Hikojima) du vibron dont elle provient. Les *précipitinogènes* des fractions I du groupe cholérique semblent plus complexes que leurs agglutinogènes. Les fractions I des vibrions NAG n'ont pas de rapports sérologiques avec celles du groupe cholérique El Tor. De plus, elles sont hétérogènes et n'ont pas permis d'établir un classement net de ces vibrions en relation avec leurs origines.

L'autre fraction (fraction II) est un protéide thermostable qu'on peut rapprocher de la protéine somatique thermostable (HSSP) de Bruce White, à la différence que celle-ci, extraite par une autre méthode, contenait une fraction polysidique. Les fractions II extraites des vibrions cholériques, El Tor et NAG ont des rapports sérologiques communs : leurs antisérums précipitent toutes les fractions II et agglutinent les hématies tannées sensibilisées par une fraction II quelconque (cholérique, El Tor ou NAG). Cet antigène protéidique est indépendant de l'antigène O commun de Gardner et Venkatraman (protéines Q de Bruce White) puisque non alcoolo-soluble et non agglutinogène pour les vibrions chauffés à 100°. L'analyse antigénique des fractions II a montré la complexité de cet antigène et révélé la présence, chez les 29 vibrions étudiés, d'au moins 10 facteurs différents, sans qu'on puisse tirer de conclusion sur leur répartition.

Bien que les antisérums II n'agglutinent pas les vibrions homologues, ce qui *a priori* pourrait indiquer que la fraction II ne se trouve pas à la surface de la bactérie, le sérum anticholérique O de référence internationale (utilisé pour le diagnostic du choléra par agglutination des vibrions suspects) agglutine de façon constante les hématies sensibilisées par les fractions II cholériques, El Tor ou NAG. Ceci, joint au fait qu'il a été possible d'extraire les deux fractions non seulement directement des *V. cholerae*, mais aussi de l'antigène cholérique O préparé suivant la technique de l'O. M. S., démontre que cet antigène O, tenu jusqu'ici pour exclusivement spécifique de *V. cholerae* et de *V. El Tor*, est en réalité constitué de deux éléments thermostables différents : le polyside spécifique et le protéide commun aux vibrions « agglutinables » et

NAG. Les caractères immunologiques de l'antigène cholérique O correspondent strictement à la somme des caractères des deux fractions actives éprouvées isolément.

Dans l'état actuel de nos connaissances sur les antigènes thermostables de *V. cholerae*, on peut donc mettre en évidence dans les vibrions chauffés à 100° trois groupes de facteurs antigéniques, à savoir :

1° Les facteurs polyosidiques, agglutinogènes et précipitinogènes spécifiques (notre fraction I).

2° Les facteurs protéidiques, hémagglutinogènes et précipitinogènes non spécifiques (notre fraction II).

3° Les facteurs protéidiques, agglutinogènes non spécifiques (antigène O commun de Gardner et Venkatraman ou protéines Q de Bruce White).

Les deux premiers groupes de ces facteurs étant contenus dans les antigènes O de référence internationale, on peut se demander si l'existence des hémagglutinogènes et précipitinogènes non spécifiques (bien qu'elle n'influe pas sur les résultats fournis par leurs antisérums en matière de diagnostic du choléra) dans ces étalons dont le but est précisément de donner toute garantie de spécificité, ne constitue pas un fait paradoxal et s'il ne conviendrait pas de remplacer ces préparations par des substances privées de tout élément non spécifique. De notre travail se dégage la constatation que les polyosides cholériques Inaba et Ogawa, extraits sous la forme de nos fractions I qui ont conservé non seulement la spécificité non différentielle des *V. cholerae*, mais aussi celle de leurs types, répondent mieux à ce dessein.

RÉSUMÉ.

Deux fractions antigéniques thermostables, extraites de chacune des 29 souches de vibrions (*V. cholerae*, *V. El Tor* et vibrions NAG) ont été étudiées vis-à-vis de leurs antisérums et du sérum choléra O de référence.

La première fraction est un polyoside agglutinogène et précipitinogène spécifique. Les polyosides extraits des vibrions cholériques et d'El Tor possèdent la spécificité du type dont ils proviennent. Les polyosides des vibrions NAG, sans relation avec le sous-groupe O I, n'ont entre eux que des rapports variables.

La seconde fraction est un protéide qui comporte des facteurs hémagglutinogènes et précipitinogènes non spécifiques, communs aux vibrions du groupe cholérique et aux vibrions NAG. Cet antigène est indépendant de l'antigène O commun non spécifique (protéine Q).

L'antigène cholérique O de référence internationale, qui contient

les deux fractions, reproduit leurs réactions sérologiques spécifiques et non spécifiques. Le sérum choléra O agglutine donc sans discrimination les hématies sensibilisées par la fraction protéidique d'un vibriion quelconque, du groupe NAG aussi bien que du groupe cholérique.

SUMMARY

STUDIES ON THE *Vibrio* ANTIGEN « O » COMPLEX.
IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIPS BETWEEN *V. cholerae*
AND THE SO-CALLED « NON-AGGLUTINABLE » VIBRIOS (NAG).

Studies on two thermostable antigenic fractions, extracted from 29 vibrios strains (*V. cholerae*, *V. El Tor* and NAG vibrios), with particular reference to their immune sera and the « O » standard serum.

The first fraction is a specifically agglutinogenic and precipitinogenic polysaccharide. The polysaccharides extracted from *V. cholerae* and *V. El Tor* possess the specificity of the original type. Between the polysaccharides extracted from the NAG vibrios (which have no relationship with the O 1 subgroup) there only exist variable relationships.

The second fraction is a protein containing non specific hemagglutinogenic and precipitinogenic factors, which are common to vibrios of the cholera group and the NAG vibrios. This antigen is independant of the non specific common O antigen (Q protein).

The international standard O antigen contains both fractions and yields their specific and non specific serological reactions. The O immune serum agglutinates erythrocytes sensitized with the protein fraction of any vibrio, either of the NAG or of the cholera group.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POLLITZER (R.) et BURROWS (W.). *Bull. O. M. S.*, 1955, **42**, 961.
- [2] GARDNER (A. D.) et VENKATRAMAN (K. V.). *J. Hyg.*, 1935, **35**, 262.
- [3] BURROWS (W.) et POLLITZER (R.). *Bull. O. M. S.*, 1958, **48**, 275.
- [4] O. M. S. *Rapports techniques*, 1958, n° 147.
- [5] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 355, et 1953, **85**, 261.
- [6] FELSENFELD (O.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **69**, 95.
- [7] FELSENFELD (O.), SOMAN (D. W.), YOUNG (V. M.), YOSHIMURA (T.), WATERS (T.) et ISHIHARA (S. I.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1951, **77**, 284.
- [8] BURROWS (W.), MATHER (A. N.), MCGANN (V. G.) et WAGNER (S. M.). *J. inf. Dis.*, 1946, **79**, 168.
- [9] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 122.
- [10] WAHBA (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 639.
- [11] KAUFFMANN (F.). *Acta pathol.*, 1950, **27**, 283.
- [12] SINGH (G.) et AHUJA (M. L.). *Ind. J. med. Res.*, 1950, **38**, 317.

- [13] MAALE (O.). *Document WHO/BS* 255, 15 septembre 1954.
 - [14] POLLITZER (R.). *Bull. O. M. S.*, 1955, **13**, 1129.
 - [15] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 455.
 - [16] GALLUT (J.), CHEVÉ (J.) et GAUTHIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 683.
 - [17] SHRIVASTAVA (D. L.), SINGH (G.) et AHUJA (M. L.). *Ind. J. med. Res.*, 1948, **36**, 409.
 - [18] MIDDLEBROOK (G.) et DUBOS (R.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
 - [19] BOYDEN (S. V.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
 - [20] SHRIVASTAVA (D. L.). *Abstracts of papers presented at the Symposium of Cholera*, Haffkine Institute, 1959.
 - [21] WHITE (P. B.). *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 449.
 - [22] BURROWS (W.). *J. inf. Dis.*, 1958, **102**, 73.
 - [23] BURROWS (W.) et SCHLUB (L. J.). *J. inf. Dis.*, 1958, **102**, 94.
 - [24] WHITE (P. B.). *J. Hyg.*, 1935, **35**, 499.
-

ACTIVITÉ LIPASIQUE DES BACILLES TUBERCULEUX ET DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

par A. ANDREJEW, Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET (*) (**).

(Institut Pasteur de Lille)

On sait que les bacilles tuberculeux se caractérisent par une très forte richesse en substances lipoïdiques, susceptibles d'atteindre 30 p. 100 et plus de leur poids sec, contre 5 à 8 p. 100 pour les germes non acido-résistants.

En obtenant l'hydrolyse de la monobutyryne, Carrière mettait pour la première fois en évidence, en 1901, une estérase dans une culture de bacilles tuberculeux [1]. Depuis, certains auteurs ont confirmé et étudié cette activité en présence d'autres substrats.

Cependant, avant l'introduction, par Gomori [2] et Archibald [3], des Tweens, dans ce domaine, on employait comme substrat, soit une huile insoluble dans l'eau, telle que l'huile d'olive [4] ou l'huile de ricin [5], soit des esters d'acides gras à courte chaîne, tels que l'acétate ou le butyrate d'éthyle [4, 5, 6], la monobutyryne [1, 6], ou la tributyrine [7] et les mono-, di- et tri-acétylglycérol [4, 8], qui ne sont pas spécifiques des lipases mais concernent plutôt les estérases simples. Une estérase cristallisée a même été préparée à partir des bacilles aviaires [9].

Il existe, à l'heure actuelle, peu d'études quantitatives de l'activité lipasique des différentes Mycobactéries, étudiée en tant qu'hydrolyse des esters polymérisés solubles d'acides gras à longue chaîne (en C_{12} — C_{18}), tels que les Tweens.

Davis et Dubos [10], qui ont introduit le Tween 80 dans le milieu de culture des Mycobactéries, ont remarqué, d'une part, que l'activité lipasique, en libérant l'acide oléique à partir de cet ester, était nuisible à la multiplication des bacilles tuberculeux dans ce milieu, et que, d'autre part, les filtrats de cultures, effectuées en présence du Tween 80, manifestaient dans certains cas (*M. phlei*) une nette activité lipasique.

L'hydrolyse des Tweens 80 et 60 par les bacilles tuberculeux

(*) Manuscrit reçu le 8 février 1960.

(**) Travail exécuté avec l'aide du C. N. R. S.

a également été signalée [41], ainsi que celle des Tweens 20, 40 et 60 [42].

Le présent travail est consacré à l'étude quantitative de l'activité lipasique de différentes Mycobactéries.

MÉTHODES.

L'activité lipasique est mesurée manométriquement, suivant la méthode dérivant de celle de Copenhaver, Stafford et McShan [43] et chimiquement, suivant les indications de Bier [44] et un procédé simplifié adapté par nous-mêmes à l'étude des Mycobactéries.

Les mesures manométriques sont faites à 38°, en atmosphère de 95 p. 100 de N_2 + 5 p. 100 de CO_2 , en présence de tampon phosphate. Na_2 + diéthylbarbiturate de Na , 0,02 M, additionné de Tween à 20 p. 100 (dans nos expériences le Tween à 10 p. 100 donnait les mêmes résultats). Le pH du mélange est ajusté au pH-mètre à 8,4 et 7,4. On ajoute le bicarbonate de Na 0,14 M et les bactéries, et on fait passer le mélange gazeux à travers les fioles agitées, à 38°, pendant dix minutes. Nous commençons les mesures quinze minutes après avoir ajouté les bactéries. Un témoin, dépourvu de bactéries, enregistre l'hydrolyse spontanée du substrat au cours de l'expérience et permet la correction des résultats, que nous exprimons en μl de CO_2 dégagés (à la suite de la réaction entre l'acide libéré et le bicarbonate) par milligramme (poids sec) de bactéries, en anaérobiose, en une heure, à 38°, la quantité de CO_2 dégagé étant proportionnelle à l'intensité de l'activité lipasique. Un autre témoin contient la suspension bacillaire préalablement chauffée pendant trente minutes à 100°. On mesure également le dégagement de CO_2 , en l'absence de Tween. Dans certains cas, les bactéries intactes sont remplacées par les extraits bacillaires ou les homogénats de foie. Au cours de chaque expérience les déterminations sont faites en double.

D'autre part, en faisant passer un léger courant d'azote à travers la solution, on dose, à l'aide de $NaOH$ 0,02 M, l'acide libéré du Tween par les bactéries, après une heure de contact, à 38°, en présence d'un témoin.

Les différences sont faibles dans le cas des bacilles tuberculeux et les mesures manométriques se révèlent donc préférables aux dosages chimiques, moins sensibles.

Les Tweens 20, 40, 60 et 80 sont des esters de poly-oxyéthylène sorbitane, renfermant, respectivement, les acides gras suivants : laurique, palmitique, stéarique et oléique.

Les bactéries sont cultivées sur milieu de Löwenstein, exceptionnellement sur milieu de Dubos sans Tween (cas précisés dans le texte) et les cultures jeunes sont mises en suspension fine et homogène au moyen des homogénéiseurs mécaniques du type Potter-Elvehjem.

Méthode simplifiée. — Pour les estimations approximatives ou qualitatives de l'activité lipasique, nous avons mis au point et employé la méthode chimique suivante : on dissout 2,42 g de tris(hydroxyméthyl) aminométhane dans 50 ml d'eau ; on ajoute 26,8 ml de HCl 0,2 M, on

complète à 1 000 ml avec de l'eau et on ajuste le pH à 8 avec HCl ou NaOH. On obtient ainsi le tampon Tris 0,02 M, pH 8.

On mélange 1 partie de la suspension bacillaire assez dense, faite dans le tampon Tris 0,02 M, pH 8, avec 5 parties de ce même tampon contenant 10 p. 100 de Tween 20, neutralisé au pH 8 et additionné de phénol-sulfone-phtaléine à 0,001 p. 100. On place le mélange à 38°, en présence d'un témoin dépourvu de bactéries. On agite.

L'activité lipasique est décelée lorsque le virage de l'indicateur de l'essai est nettement plus rapide que celui du témoin. On note le temps et on le rapporte au poids sec des bactéries employées.

Le Tween 20 peut être remplacé par la tributyrine, à la concentration finale de 50 μ M/ml, pour la mise en évidence de l'activité des estérases simples chez les Mycobactéries.

RÉSULTATS.

L'activité lipasique des bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires, virulents et avirulents, est généralement faible (tableau I). Il n'y a pratiquement pas de différence entre une souche virulente (H37Rv) et une souche avirulente (H37Ra).

TABLEAU I. — Hydrolyse des Tweens par les bacilles tuberculeux typiques.

N°		Souche	Age (jours)		Tween	μ l CO ₂ /mg/h.	
			38°	4°		pH 8,4	pH 7,4
1	BACILLES TUBERCULEUX VIRULENTS	H37 Rv	13	1	20	10	13
2		H37 Rv	13	2	80	7	10
3		R1 Rv	22		20		13
4		R1 Rv	22	1	80	4	5
5		Ravenel	15		20	3	3,5
6		Ravenel	15	1	80	2	5
7		Aviaire B	11		20	1,6	2,2
8		Aviaire FPI	11		20	4,3	4,4
9		Aviaire 2538	11		20	2,6	3,4
10		Aviaire 17	12		20	5	5,1
11		Aviaire 11.2.57	12	1	20	3,8	4,6
12		Aviaire FPIII	12	1	20	1,4	1,5
13		Aviaire Sheard	14	1	20	9,1	9,6
14		Aviaire F	9	2	20	10,6	11,3
15		Aviaire C	16		20	2	3
16		Aviaire C, résistants à 2000 γ d'INH/ml.	16		20	2	2,5
17	BACILLES TUBERCULEUX AVIRULENTS	H37 Ra	17		20	9	14
18		H37 Ra, résistants à 100 γ d'INH/ml.	17		20	13	15
19		H37 Ra, résistants à 100 γ de d-cyclosérine/ml.	17		20		16
20		H37 Ra	13	4	60	3	4
21		H37 Ra	17		80	6	8
22		H37 Ra, résistants à 100 γ d'INH/ml	17		80	7	8
23		DCG 847	11		20	8	10
24		BCG 847, résistants à 100 γ d'INH/ml.	11		20	6	10
25		BCG 847, résistants à 100 γ de d-cyclosérine/ml.	11		20	7	10
26		BCG 847	14		40	4,6	5,5
27		BCG 847, résistants à 100 γ d'INH/ml.	14		40	5	5,4
28		BCG 847	11		80	4	5
29		BCG 847, résistants à 100 γ d'INH/ml.	11		80	3	5
30		BCG 847, résistants à 100 γ de d-cyclosérine/ml.	11		80	4	5

L'activité lipasique des souches bovines et aviaires est, en général, légèrement inférieure à celle des bacilles tuberculeux humains que nous avons étudiés.

L'activité lipasique très faible de ces bacilles pourrait, d'ailleurs, être due à des estérases simples, qui, comme on le sait, peuvent agir faiblement sur les esters contenant des acides gras à longue chaîne (bien que ces esters soient des substrats non spécifiques pour ces enzymes). Dans certains cas, l'activité lipasique est nulle ou à peine perceptible chez les bacilles intacts, surtout lorsqu'on tient compte du fait que ces mêmes bacilles dégagent, dans nos conditions d'expérience, en anaérobiose, de très faibles quantités de CO_2 , même en l'absence de Tween. Etant donné la richesse de ces bactéries en graisses, ce phénomène pourrait être dû, en partie, à l'hydrolyse lipasique des graisses endobacillaires, ainsi qu'à une très faible glycolyse anaérobie. En effet, dans le milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté, nous obtenons, en anaérobiose, à 38° , les quantités suivantes de CO_2 , par milligramme (poids sec) de Mycobactéries atypiques (métabolisme endogène), en une heure : 0,3 μl pour *M. yellow*, 0,3 μl pour R 15, 1 μl pour *M. szym.*, préalablement exposé ou non à la lumière, et 0,9 μl pour *M. phlei* 525. Dans les mêmes conditions, nous obtenons entre 0 et 0,5 μl de CO_2 pour les souches étudiées de bacilles tuberculeux. Suivant les souches, l'addition de glucose, de fructose ou de glycérol augmente légèrement ces valeurs dans certains cas. Les travaux concernant ce problème sont en cours.

Lors de précédentes recherches, nous avons vu que, contrairement aux bacilles tuberculeux sensibles à l'INH, les bacilles tuberculeux résistants à l'INH ont une activité peroxydasique extrêmement faible ou nulle [15, 16, 17].

En ce qui concerne l'activité lipasique, il n'existe pas de différence significative entre les souches sensibles de bacilles tuberculeux et les souches correspondantes, adaptées et devenues résistantes à l'INH ou à la D-cyclosérine (tableau I).

D'autre part, l'INH, comme la D-cyclosérine, même 0,01 M, n'exerce aucune action directe sur l'activité lipasique d'un homogénat de foie (cobaye), mesurée dans les conditions habituelles, en présence du Tween 20.

Lorsqu'on ensemence le milieu de Dubos sans Tween avec le BCG 847 et qu'on ajoute, au septième jour, 100 $\mu\text{g/ml}$ d'INH, on obtient, après quatorze jours à 38° , une culture de bactéries en partie non acido-résistante, conformément à l'observation déjà connue [18]. L'activité lipasique de cette culture, mesurée en présence de Tween 20, se révèle pratiquement semblable à celle de la culture-témoin : très faible dans les deux cas (4 μl $\text{CO}_2/\text{mg/h}$, pH 7,4). Le milieu de Dubos lui-même (dépourvu de Tween), qui

a servi à la culture du BCG 847, pendant quinze jours, ne possède qu'une activité lipasique extrêmement faible ou nulle.

L'activité lipasique des Mycobactéries (mesurée en présence du Tween 20) peut varier en fonction du milieu de culture : elle est nettement plus élevée pour le BCG 847 cultivé sur le milieu de Löwenstein (10 μ l CO₂/mg/h, pH 7,4) que pour cette même souche cultivée sur le milieu de Dubos sans Tween (4 μ l CO₂/mg/h, pH 7,4). De même, on obtient pour *M. phlei* 525, respectivement, 90-100 μ l CO₂/mg/h, pH 7,4 (milieu de Löwenstein) et 70 μ l CO₂/mg/h, pH 7,4 (milieu de Dubos sans Tween).

M. grassberger (tableau III), souche dont l'acido-résistance s'est atténuée spontanément, possède une activité lipasique deux à trois fois plus faible que celle de *M. phlei* ou de *M. pellegrino*, cultivés dans les mêmes conditions (milieu de Löwenstein). Ces deux phénomènes (atténuation spontanée de l'acido-résistance et activité lipasique relativement affaiblie) ne sont pas, cependant, nécessairement liés. Les bacilles tuberculeux peuvent posséder, à la fois, et une forte acido-résistance (Ravenel ou aviaire C, par exemple), et une très faible activité lipasique (tableau I), dix fois plus faible que celle de *M. grassberger*.

On sait que les graisses représentent, respectivement, 6,3, 11,3 et 9,1 p. 100 du poids sec des bacilles tuberculeux humains et aviaires et de *M. phlei*, cultivés dans un bouillon glycérimé ; leur teneur totale en substances lipoidiques est de 14, 24,3 et 11,9 p. 100, respectivement [49]. Puisque les lipases catalysent aussi bien l'hydrolyse que la synthèse des graisses (esters de glycérol et d'acides gras à longue chaîne), la très nette différence d'activité lipasique qui existe entre les bacilles tuberculeux (activité très faible, tableau I) et *M. phlei* (activité relativement forte, tableau III) peut conditionner, en partie, la croissance beaucoup plus lente des bacilles tuberculeux (trois à quatre semaines sur bouillon glycérimé, ou sur milieu de Sauton), par rapport à celle de *M. phlei* (trois jours sur les mêmes milieux). En effet, pour produire une quantité aussi importante de graisses, et même éventuellement plus importante, les bacilles tuberculeux nécessiteraient plus de temps que *M. phlei*, puisque leur activité lipasique est dix à vingt fois plus faible.

Cependant, s'il est possible que l'activité lipasique soit un des facteurs-limites de la croissance, cela ne pourrait avoir lieu que dans certains cas, puisque la vitesse de multiplication de deux souches peut être assez semblable et leurs activités lipasiques nettement différentes : par exemple, *M. fortuitum* se multiplie aussi vite, sinon plus vite, que les Mycobactéries atypiques photochromogènes, alors que l'activité lipasique est faible dans le premier cas et forte dans le second. L'activité lipasique déficiente

chez certaines Mycobactéries pourrait donc, semble-t-il, être compensée par d'autres voies de synthèse des lipides. D'ailleurs, la structure de certaines substances lipoidiques synthétisées par les Mycobactéries peut varier d'une souche à l'autre [20].

En ce qui concerne l'activité lipasique, est-il possible d'attribuer aux différents groupes de la classification actuelle des Mycobactéries atypiques, établie par Runyon [21], des caractéristiques bien déterminées ?

Comme nous l'avons vu plus haut, toutes les souches étudiées de bacilles tuberculeux possèdent une activité lipasique très faible ou nulle (tableau I).

TABLEAU II. — **Activité lipasique des Mycobactéries atypiques photochromogènes (groupe 1 de Runyon [21]), exposées (lumière) ou non (obscurité) à la lumière.**

N°	Souche	Age (jours)		Tween	p CO /mg/h.	
		38°	4°		pH 8,4	pH 7,4
1	M. yellow (lumière)	11		20	105	110
2	M. yellow (obscurité)	11		20	102	107
3	R. 440 (lumière)	8	11	20	70	100
4	R. 440 (obscurité)	8	11	20	86	133
5	R. 15 (lumière)	8	5	20	96	104
6	R. 15 (obscurité)	8	4	20	108	129
7	M. Szym. (lumière)	8	10	20	60	70
8	M. Szym. (obscurité)	8	10	20	63	68
9	M. Der. (lumière)	7	1	20	64	65
10	M. Der. (obscurité)	7	1	20	56	58
11	M. Fie (lumière)	9	2	20	81	90
12	M. Fie (obscurité)	9	2	20	73	80
13	M. lef. (lumière)	10	2	20	81	83
14	M. lef. (obscurité)	10	2	20	98	100
15	M. catt. (lumière)	11	1	20	83	80
16	M. War. (lumière)	11		20	77	76
17	M. War. (obscurité)	11	5	20	83	87
18	M. Four. (lumière)	11		20	88	94
19	M. Four. (obscurité)	11	5	20	77	79
20	M. For. (lumière)	10	2	20	67	68
21	OMS 8 (lumière)	7	1	20	70	79
22	OMS 8 (obscurité)	7	1	20	83	99
23	OMS 8 (lumière)	7	1	80	72	83
24	OMS 8 (obscurité)	7	1	80	55	60
25	OMS 8 (lumière)	11		20	117	124
26	OMS 8 (obscurité)	11		20	103	110
27	OMS 8 (lumière)	17		20	135	147
28	OMS 8 (obscurité)	17		20	120	123
29	OMS 8 (lumière)	25		20	119	128
30	OMS 8 (obscurité)	25		20	135	158
31	OMS 8 (lumière)	30		20	104	105
32	OMS 8 (obscurité)	30		20	112	120

Le tableau II montre que toutes les souches de Mycobactéries atypiques photochromogènes (groupe I de Runyon) que nous avons étudiées, se distinguent très nettement des bacilles tuberculeux par une forte activité lipasique, environ dix fois plus forte que celle des bacilles tuberculeux. Les résultats obtenus dans ce

sens par la méthode manométrique sont confirmés par le procédé chimique. L'activité lipasique d'une souche photochromogène reste inchangée, qu'elle soit exposée ou non à la lumière (tableau II).

Toutes les souches étudiées de Mycobactéries atypiques non photochromogènes (type « Battey », groupe III de Runyon), possèdent, par contre, une activité lipasique très faible ou nulle (tableau III), semblable à celle des bacilles tuberculeux (tableau I).

Ainsi, au cours de ce travail, nous n'avons rencontré aucune exception en ce qui concerne les caractéristiques de l'activité lipasique d'un de ces trois groupes de Mycobactéries : d'une part, les bacilles tuberculeux et les Mycobactéries atypiques non photochromogènes (activité faible ou nulle) et, d'autre part, les Mycobactéries photochromogènes (activité forte).

Le tableau III montre qu'il n'en est pas de même pour les Mycobactéries « à croissance rapide » (groupe IV de Runyon) ou scotochromogènes (groupe II de Runyon), dont l'activité lipasique peut être forte ou très faible suivant les souches.

Dans le groupe des Mycobactéries à croissance rapide, *M. phlei*

TABLEAU III. — Activité lipasique des Mycobactéries atypiques scotochromogènes, non photochromogènes, et des Mycobactéries « à croissance rapide ». (Respectivement, groupes II, III et IV de la classification de Runyon [21].)

N°		Souche	Age (jours)		Tween	µl CO ₂ /mg/h.	
			38°	4°		pH 8,4	pH 7,4
1	scotochromogènes	OMS 11	7	3	20	84	94
2		M. Vas.	11	3	20	52	60
3		M. Duj.	11	2	20	25	29
4		R 251	11	2	20	6	5
5		R 322	7	1	20	2	2,4
6	non photochromogènes	R 160	11		20	13,3	13,5
7		R 357	11	2	20	6,4	6
8		M. fo.	11		20	2,4	2,5
9		M. buh.	13	3	20		7,8
10		M. val.	13	3	20		3
11		M. kop.	12	1	20	10,9	12,5
12	MYCOBACTERIES ATYPIQUES "à croissance rapide"	M. phlei 525	4		20	76	91
13		M. phlei 525, résistants à 3000 γ d'INH/ml	4		20	99	100
14		M. phlei 525	7		40	78	74
15		M. phlei 525	6	3	60	87	83
16		M. phlei 525	4		80	87	88
17		M. phlei I.P.	3		20	99	100
18		M. pellegrino	4		20	56	68
19		M. Grassberger	6	1	20	37	39
20		M. fortuitum 389	7	1	20	10	11
21		M. fortuitum 1101	8	1	20		16,5
22		M. smegmatis 690	7	1	20	12	13
23		M. smegmatis 8152	7	1	20	31	32
24		M. lacticola	4		20	29	31

par exemple, possède une activité lipasique relativement forte, semblable à celle des souches photochromogènes (tableau II), tandis que *M. fortuitum* 389 ou *M. smegmatis* 690 ont une activité environ dix fois plus faible, proche de celle des bacilles tuberculeux (tableau I), et *M. smegmatis* 8152 ou *M. lacticola*, une activité intermédiaire entre les deux groupes réunis respectivement dans les tableaux II et I.

Parmi les Mycobactéries atypiques scotochromogènes, R 251 et R 322 ont une activité lipasique très faible, semblable à celle des bacilles tuberculeux, tandis que les souches OMS 11 et *M. vas.* possèdent une activité relativement forte (tableau III), semblable à celle des bacilles photochromogènes (tableau II).

Notons que pour un même milieu (Löwenstein) *M. phlei* se multiplie plus rapidement que *M. fortuitum* ou *M. smegmatis*. De même, les souches scotochromogènes OMS 11 et *M. vas.* se multiplient nettement plus vite que les souches R 251 ou R 322, qui sont cependant classées dans le même groupe et qui sont entraînées de la même façon sur le milieu de Löwenstein. Il semble donc qu'au sein d'un même groupe, plus ou moins hétérogène comme le sont ces deux derniers groupes (groupes II et IV de Runyon), ce sont les souches qui se multiplient plus rapidement qui possèdent, dans certains cas, une activité lipasique plus forte.

Comme l'ont signalé Kendall, Walker et Day [5], l'activité lipasique de certaines souches de Mycobactéries paraît thermostable.

Le tableau IV montre, sur l'exemple de *M. phlei* 525, qu'un chauffage de trente minutes à 100° n'inhibe l'activité lipasique des

TABLEAU IV. — Hydrolyse du Tween 80 par *M. phlei* 525.

M. phlei 525	Age de la culture (jours)	µl de CO ₂ dégagés, à pH 8,4, en fonction du temps (minutes)				°% d'inhibition
		15	30	45	60	
Bactéries intactes (1 mg en poids sec)	4	12	25	39	52	
Bactéries intactes chauffées 30 min. à 100° (1 mg)	4		8	13	19	65
Surnageant du broyat (0,45 mg de surnageant en poids sec)	12	10	23	37	49	
Surnageant du broyat (1,8 mg)	12	65	118	172	207	
Surnageant du broyat (3,6 mg)	12	118	210	308	420	
Surnageant du broyat (3,6 mg) chauffé 30 min. à 100°	12	20	28	33	39	93

bactéries que de 65 p. 100 environ. Cependant, le surnageant chauffé du broyat de ces bactéries (obtenu à froid, en présence de sable, et centrifugé vingt minutes à froid, à 20 000 g) ne manifeste qu'une faible activité (inhibition de 93 p. 100). Il semble donc que la différence soit due, en partie, à l'effet protecteur que les bactéries entières exercent sur l'enzyme. Signalons que plusieurs souches (H37Rv, R1Rv, Ravenel, aviaire C, OMS 8, *M. yellow* et autres), même sans avoir subi de broyage, ne manifestent après chauffage qu'une activité extrêmement faible ou nulle.

Il résulte, d'autre part, du tableau IV, que l'activité lipasique du surnageant de broyat, débarrassé des corps bacillaires, est, tout au moins dans certaines limites, strictement proportionnelle à la quantité de l'extrait employé. Au cours de trente à soixante minutes d'expérience, cette activité est linéaire dans le cas des bacilles intacts et ne semble pas subir de baisse appréciable dans le cas du surnageant de broyat.

TABLEAU V. — Hydrolyse comparée des Tweens 20, 40, 60 et 80, ainsi que de la tributyrine et de la triacétine, par les bacilles tuberculeux et les Mycobactéries atypiques de différents groupes.

N°	Souche	Age (jours)		$\mu\text{l CO}_2/\text{mg/h.}$, en présence de :					
		38°	4°	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Tributyrine (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$)	Triacétine (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$)
Bacilles tuberculeux	H37Ra	13	3	14,2	8	6,6	7,3	210	212
	BCG 847	10	2	6,8	3,2	2,2	2,1	162	160
	Aviaire 11	12	3	5,5	2,4	1,5	1,5	46	48
	Aviaire B	23	1	1,2	1,3	0,9	0,9	19	27
	Aviaire B résistants à 3000 Y d'INH/ml.	23	1	2,3	1,8	1,7	1,5	9,5	9,4
Mycobactéries atypiques	Groupe I								
	Groupe II								
	Groupe III								
	Groupe IV								

De même, dans d'assez larges limites de temps, l'activité lipasique des bactéries ne varie pas d'une façon appréciable en fonction de l'âge de la culture [exemple : OMS 8 (tableau II)].

Le tableau V montre que, dans les mêmes conditions, les différentes Mycobactéries ne se comportent pas de la même façon, en

ce qui concerne l'hydrolyse des différents Tweens (20, 40, 60 ou 80).

Les Mycobactéries à faible activité lipasique (tableau I), telles que les bacilles tuberculeux (H37Ra, BCG 847 ou aviaire 17) hydrolysent pour un même temps, environ deux fois plus de Tween 20, que des Tweens 40, 60 ou 80 (fig. 1).

Par contre, certaines Mycobactéries à forte activité lipasique (tableaux II et III), telles que *M. yellow* ou *M. phlei*, hydrolysent tous ces Tweens avec une intensité assez semblable, avec

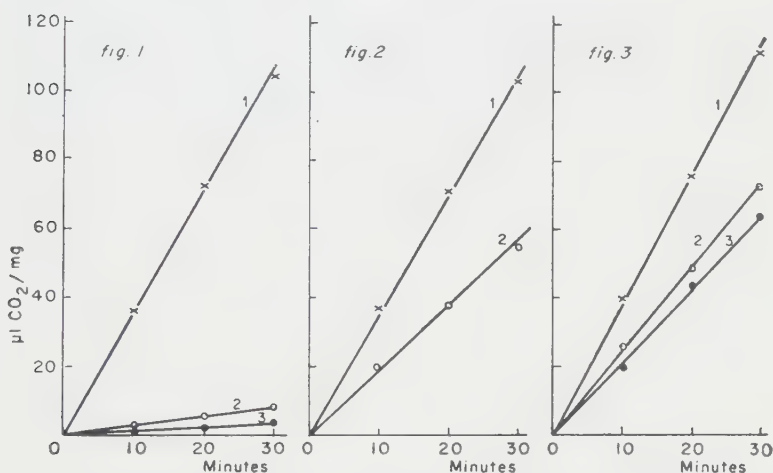


FIG. 1. — Hydrolyse de la tributyrine et de la triacétine (1), du Tween 20 (2) et des Tweens 40, 60 et 80 (3) par H37Ra, en fonction du temps.

FIG. 2. — Hydrolyse de la tributyrine et de la triacétine (1) et des Tweens 20, 40, 60 et 80 (2) par *M. yellow* (Mycobactérie atypique photochromogène).

FIG. 3. — Hydrolyse de la tributyrine et de la triacétine (1), du Tween 20 (2) et des Tweens 40, 60 et 80 (3) par *M. phlei* I. P.

une légère préférence pour le Tween 20 dans certains cas (fig. 2 et 3).

Il résulte, d'autre part, du tableau V que les bacilles tuberculeux, H37Ra, BCG 847 ou aviaire 17, hydrolysent beaucoup plus facilement les esters simples (tributyrine, triacétine) que les esters polymérisés renfermant des acides gras à longue chaîne (Tweens).

Ainsi, il existe chez H37Ra ou BCG 847 une forte activité des

estérases simples, tout à fait comparable à celle de *M. yellow* ou de *M. phlei* (tableau V, fig. 1, 2 et 3).

Dans les mêmes conditions, l'hydrolyse de la tributyrine ou de la triacétine par les bacilles aviaires s'est montrée nettement plus faible que celle qui est produite par H37Ra et BCG.

CONCLUSIONS.

Les auteurs rapportent les résultats des mesures quantitatives de l'activité lipasique (hydrolyse des Tweens) et de l'activité des estérases simples (hydrolyse de la tributyrine ou de la triacétine) de différentes Mycobactéries. Une méthode simplifiée de mise en évidence de ces activités chez les Mycobactéries est décrite.

Suivant leur activité lipasique, les Mycobactéries peuvent être divisées en deux grands groupes : les Mycobactéries à activité faible ou nulle, et les Mycobactéries à activité forte.

L'activité lipasique est faible (et dans certains cas pratiquement nulle) chez tous les bacilles tuberculeux typiques, humains, bovins et aviaires, virulents ou avirulents, que nous avons étudiés.

L'activité lipasique de toutes les Mycobactéries atypiques *photochromogènes* que nous avons étudiées s'est montrée, par contre, environ dix fois plus forte que celle des bacilles tuberculeux typiques.

L'activité lipasique des Mycobactéries atypiques des autres groupes se rapproche soit de celle des bacilles tuberculeux typiques (activité faible), soit de celle des bacilles *photochromogènes* (activité relativement forte). C'est ainsi que l'activité lipasique des Mycobactéries atypiques *non photochromogènes* que nous avons étudiées s'est révélée très faible, semblable à celle des bacilles tuberculeux typiques.

Les groupes des Mycobactéries à *croissance rapide* et des Mycobactéries *scotochromogènes* sont hétérogènes : leur activité lipasique est relativement forte (*M. phlei*, OMS 11), modérée (*M. lacticola*), ou faible (*M. fortuitum*, R 322), suivant les souches.

Les Mycobactéries qui possèdent une forte activité lipasique hydrolysent avec une intensité semblable les Tweens 20, 40, 60 ou 80. Les Mycobactéries à faible activité lipasique hydrolysent généralement deux fois plus vite le Tween 20 que les autres Tweens.

On voit que l'étude de l'activité lipasique (hydrolyse de Tweens) révèle, entre certains groupes de Mycobactéries, des différences très appréciables. Il n'en est pas de même de l'activité des estérases simples (hydrolyse de la tributyrine et de la triacétine) qui demeure, en dehors de quelques exceptions, relativement forte pour toutes les Mycobactéries étudiées.

SUMMARY

LIPASE ACTIVITY OF THE TUBERCLE BACILLI
AND ATYPIC MYCOBACTERIA.

Quantitative studies on lipase activity (hydrolysis of Tweens) and esterase activity (hydrolysis of tributyrin and triacetin) in various *Mycobacteria*. Description of a simple technique for the demonstration of these activities.

According to their lipase activity, the *Mycobacteria* can be divided into two main groups : *Mycobacteria* possessing a weak or nil activity ; *Mycobacteria* possessing a strong activity.

The lipase activity is weak in all typical tubercle bacilli (human, bovine, avian, virulent and avirulent).

The lipase activity of all the atypical photochromogeneous *Mycobacteria* is a tenfold that of typical tubercle bacilli.

The lipase activity of *Mycobacteria* belonging to other groups is either weak (like that of typical t. b.), or relatively strong (like that of the photochromogeneous *Mycobacteria*).

Both « rapide growth » and scotochromogeneous *Mycobacteria* groups are heterogeneous : their lipase activity is rather strong (*M. phlei*, OMS 11), moderate (*M. lacticola*), or weak (*M. fortuitum*, R 322), according to the strains.

Mycobacteria possessing a strong lipase activity hydrolyse Tween 20 twice more rapidly than the other Tweens.

The findings are different with the simple esterases : their activity is always rather strong, whichever the *Mycobacteria* studied.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARRIÈRE (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1901, **53**, 320.
- [2] GOMORI (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1945, **58**, 362.
- [3] ARCHIBALD (R. M.). *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 443.
- [4] WELLS (H. G.) et CORPER (H. J.). *J. inf. Dis.*, 1912, **11**, 388.
- [5] KENDALL (A. I.), WALKER (A. W.) et DAY (A. A.). *J. inf. Dis.*, 1914, **15**, 443, 451, 455.
- [6] LOBSTEIN (J. E.). *Thèse*, Université de Strasbourg, 1922.
- [7] MICHAELIS (L.) et NAKAHARA (Y.). *Z. Immunitätsf.*, 1923, **36**, 449.
- [8] BLOCH (H.), MATTER (E.) et SUTER (E.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 540.
- [9] HOSHISHIMA (K.). *Fukushima J. med. Sci.*, 1955, **2**, 179.
- [10] DAVIS (B. D.) et DUBOS (R. J.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 11.
- [11] HATTORI (S.), OSHIMA (Y.), HAGIHARA (T.), NAGATA (Y.) et MISHIMA (J.). *Kekkaku*, 1955, **30**, 716.
- [12] PRINA (C.). *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1953, **32**, 40.

- [13] COPENHAVER (J. H.), STAFFORD (R. O.) et MCSHAN (W. H.). *Arch. Biochem.*, 1950, **26**, 260.
 - [14] BIER (M.) in *Methods in Enzymol.*, par COLOWICK (S. P.) et KAPLAN (N. O.), 1955, **1**, 630.
 - [15] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 586.
 - [16] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 145.
 - [17] ANDREJEW (A.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **10**, 37.
 - [18] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 765.
 - [19] CHARGAFF (E.) et DIERYCK (J.). *Biochem. Z.*, 1932, **255**, 319.
 - [20] GASTAMBIDE-ODIER (M. M.), SMITH (D. W.), RANDALL (H. M.) et KOEVOET (A. O.). *Am. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 843.
 - [21] RUNYON (E. H.). *Med. Clin. North Amer.*, 1959, **43**, 273.
-

LES PROPRIÉTÉS LYTQUES DU SÉRUM

I. — INDIVIDUALISATION D'UN FACTEUR DU SÉRUM HUMAIN NORMAL, L'OBSISTINE

par L. COLOBERT et A. KIRN (*)

[avec la collaboration technique de Renée GOUJEAUD
et Jacques DEBATTY].

(Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées, 108, boulevard Pinel, Lyon)

Se servant d'embryons de poulet, M^{mes} Grabar et Le Minor ont mis au point une méthode de titrage des propriétés d'antivirulence qui se développent dans le sérum des sujets vaccinés contre les salmonelloses [18, 19, 20 et 21]. Des tentatives pour mettre en évidence *in vitro* ces propriétés, nous ont amenés à nous intéresser aux propriétés lytiques du sérum humain normal (1) vis-à-vis de diverses espèces bactériennes à Gram négatif. Nous avons ainsi individualisé un facteur lytique qui ne paraît identifiable à aucun de ceux décrits avec quelque précision dans la littérature, abondante mais malheureusement fréquemment abstruse, qui se rapporte aux substances antimicrobiennes du sérum. Pour plus de facilité et pour éviter toute équivoque, nous avons cru utile de le désigner provisoirement sous le nom d'*obsistine*, dérivé du latin *obsistere* : s'opposer, en faisant ainsi allusion à son rôle éventuel dans l'autarcèse.

MÉTHODES ET TECHNIQUES.

Les sérums humains étudiés proviennent de sujets qui, en principe, ne possèdent pas d'anticorps antisalmonelles provoqués par une vaccination ou une infection antérieure. Pour éviter des erreurs grossières, les observations ont toujours été répétées sur un nombre suffisant de sérums différents. La séparation du caillot est pratiquée en général vingt-quatre heures après le prélèvement du sang. Le sérum stérile est

(*) Manuscrit reçu le 29 février 1960.

(1) Dans ce texte, nous appelons *sérum humain normal*, le sérum de sujets n'ayant pas été vaccinés contre les salmonelloses ni contre d'autres affections bactériennes, et pour lesquels on n'a pas dans les antécédents la notion d'une infection typho-paratyphique.

alors conservé à la glacière sans précautions particulières. Les propriétés lytiques persistent dans ces conditions plusieurs semaines sans diminution ; elles se conservent également dans les sérums congelés à -20° . La bactérie d'épreuve utilisée dans ce travail est la souche O-901 d'*Eberthella typhi* dont la formule antigénique est IX, XII₁, XII₂, XII₃. Elle ne possède pas d'antigène Vi ; les antigènes H ne sont pas totalement absents, et le microscope électronique montre que, parfois, un petit nombre de bactéries est cilié. Les bactéries sont cultivées sur gélose ordinaire à 37° et récoltées au bout de seize heures environ.

L'activité lytique est mise en évidence dans les conditions de normalisation suivantes : dans la cuve de section carrée (1 cm de côté) du photomètre tricellule Jobin et Yvon équipé de l'écran sélectif de la longueur d'onde 7 800 Å, on place 3 cm³ de dilution au 1/3 du sérum à étudier dans un tampon phosphate 0,66 M de pH 7,2 ; puis 1 cm³ de suspension ajustée de bactéries dans le même tampon, telle que diluée dix fois sa densité optique soit de 0,400. Le sérum se trouve donc à la dilution finale de 1/4 en tampon phosphate. La densité optique finale est de 1. La température équilibrée au départ est maintenue fixe suivant les cas, soit à 37° , soit à 28° .

L'activité lytique attribuée au lysozyme est mise en évidence sur des suspensions de *Sarcina flava* dans des conditions que nous avons déjà longuement décrites [10], de même que les conditions d'extraction du lysozyme contenu dans le sérum par adsorption à 0° sur *Sarcina flava* [41].

Le zymosan utilisé pour l'adsorption de la properdine est un produit des laboratoires Fleischmann (2) portant le numéro de lot 9 B 551 type A et garanti conforme aux normes de Pillemer.

Le microscope électronique utilisé est de marque Philips. Les préparations sont simplement obtenues par dessiccation à l'air des échantillons sur des lames de verre sans fixation préalable ; elles sont ensuite ombrées au palladium.

L'élimination des cations bivalents du sérum a été réalisée par la méthode utilisée par Pillemer [28], qui a permis à celui-ci de mettre en évidence le rôle joué par le magnésium dans l'activité de la properdine. 750 g d'amberlite XE 64 (variété plus fine de l'amberlite XE 50 utilisée par Pillemer), en cycle H, sont traités par 500 cm³ de solution de chlorure de sodium 0,3 M. On ajoute 500 cm³ d'eau distillée et on ajuste le pH à 7,7. On lave alors la résine à l'eau distillée jusqu'à élimination de l'ion chlorure.

Pour extraire le magnésium et le calcium du sérum, on agite dix minutes à 0° un volume de sérum avec un volume égal de résine sédimentée.

RÉSULTATS.

1° LYSE D'*Eberthella typhi* PAR LE SÉRUM HUMAIN NORMAL. — L'étude des propriétés lytiques du sérum humain normal a été réalisée par l'observation photométrique des suspensions microbiennes, conjuguée à des observations morphologiques en micro-

(2) Commercialisé par « Standard Brands Incorporated », 591 Madison avenue, New-York, N. Y.

scopie photonique et électronique. On constate en effet au photomètre, quand on se place dans les conditions telles que nous les avons normalisées et par conséquent en présence de phosphates, que l'opacité de la suspension bactérienne diminue progressivement. La figure 1 présente la variation de la densité optique dans le cas de la souche O-901 d'*Eberthella typhi*. La chute

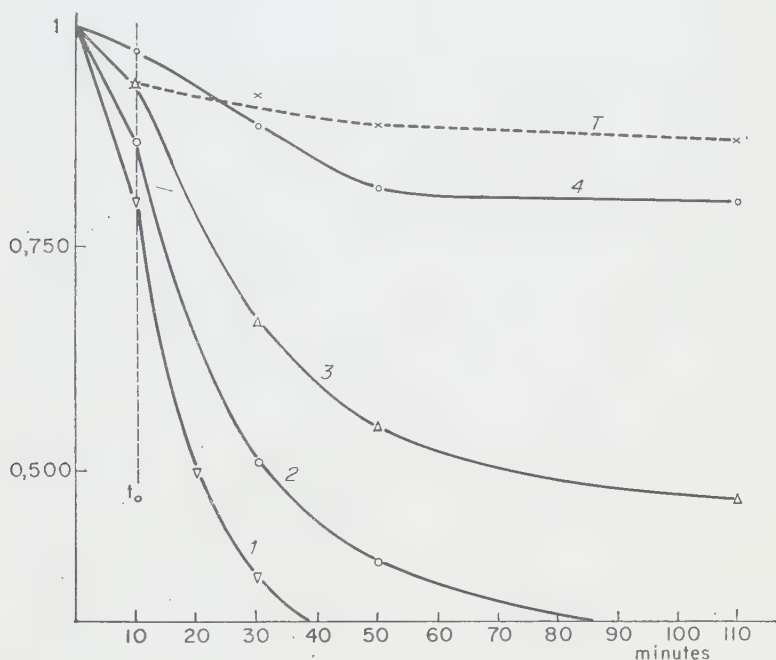


FIG. 1. — Influence de la dilution du sérum sur la lyse exprimée par la variation de la densité optique de la suspension. T : sérum inactivé par chauffage, trente minutes à 52°. 1, 2, 3, 4, dilutions respectives du sérum au 1/8, 1/10, 1/13, 1/20. Le début de la lyse due à l'obsistine commence au temps t_0 .

observée est nettement diphasique, un changement de pente se manifestant vers la dixième minute ; puis la lyse se poursuit pendant une heure environ mais n'aboutit pas à une clarification totale de la suspension bactérienne, la valeur de l'opacité résiduelle dépendant des conditions expérimentales et notamment du rapport entre la concentration en bactéries et la dilution du sérum. L'étude morphologique menée de manière concomitante à l'observation photométrique a permis de préciser le mécanisme du phénomène. L'examen en contraste de phase a offert de grandes facilités pour suivre les étapes intermédiaires des altérations morpho-

logiques, mais s'est révélé peu commode pour définir leur chronologie. Il montre qu'au bout de quelques minutes, alors que les bactéries avaient jusque-là conservé leur forme bacillaire, un grand nombre d'entre elles se transforment rapidement en éléments sphériques, réfringents, dont le diamètre est de l'ordre de grandeur de la longueur des bactéries : éléments morphologiquement identiques à ceux que l'on peut obtenir sous des influences diverses telles que la pénicilline [22, 25, 27 et 46], le lysozyme [5] et que Mac Quillen a proposé de désigner sous le nom de *sphéroplast*, ce qui a l'avantage de ne rien présumer sur leur nature.

On a observé également des formes en massues et en citron, étapes de la transformation en sphéroplast ; cependant il persiste toujours un certain nombre de bactéries qui conservent leur forme et leur aspect habituels.

Après ces transformations qui s'achèvent vers la trentième minute, débute une longue phase caractérisée par la diminution de réfringence de tous les éléments même de ceux qui ont conservé la forme bactérienne normale, mais elle est plus accentuée chez les sphéroplast et chez les formes en citron ou renflées, qui semblent se vider de leur contenu, deviennent de plus en plus difficiles à observer et finalement disparaissent. Au bout d'une heure environ, 50 à 80 p. 100 des bactéries ont ainsi disparu et il ne subsiste plus à côté de quelques-unes qui ont conservé leur forme, que quelques sphéroplast à contours flous et à la limite de la visibilité.

La coloration de ces bactéries en cours de transformation s'est révélée difficile. La coloration de Gram, celle de Giemsa, de

PLANCHE I

Eberthella typhi. $\times 35\ 000$.

FIG. 1 et 2. — Sixième minute environ, sphéroplast. Sur la figure 1, on remarque une bactérie qui a conservé sa forme.

FIG. 3. — Dixième minute environ, forme en citron.

FIG. 4. — Quinzième minute environ, sphéroplaste à un stade avancé de lyse, le contour est devenu flou et imprécis.

FIG. 5. — Stade avancé de la lyse avant la destruction complète.

Shigella flexneri. $\times 13\ 000$.

FIG. 6 et 7. — Les aspects de la lyse sont analogues à ceux de *E. typhi*, cependant les formes en massues sont beaucoup plus fréquentes, peut-être parce que les bactéries sont beaucoup plus allongées. Les sphéroplast ont un diamètre beaucoup plus petit que la longueur de la bactérie.

FIG. 8. — Stade avancé de la lyse, la paroi paraît déjà dissoute.

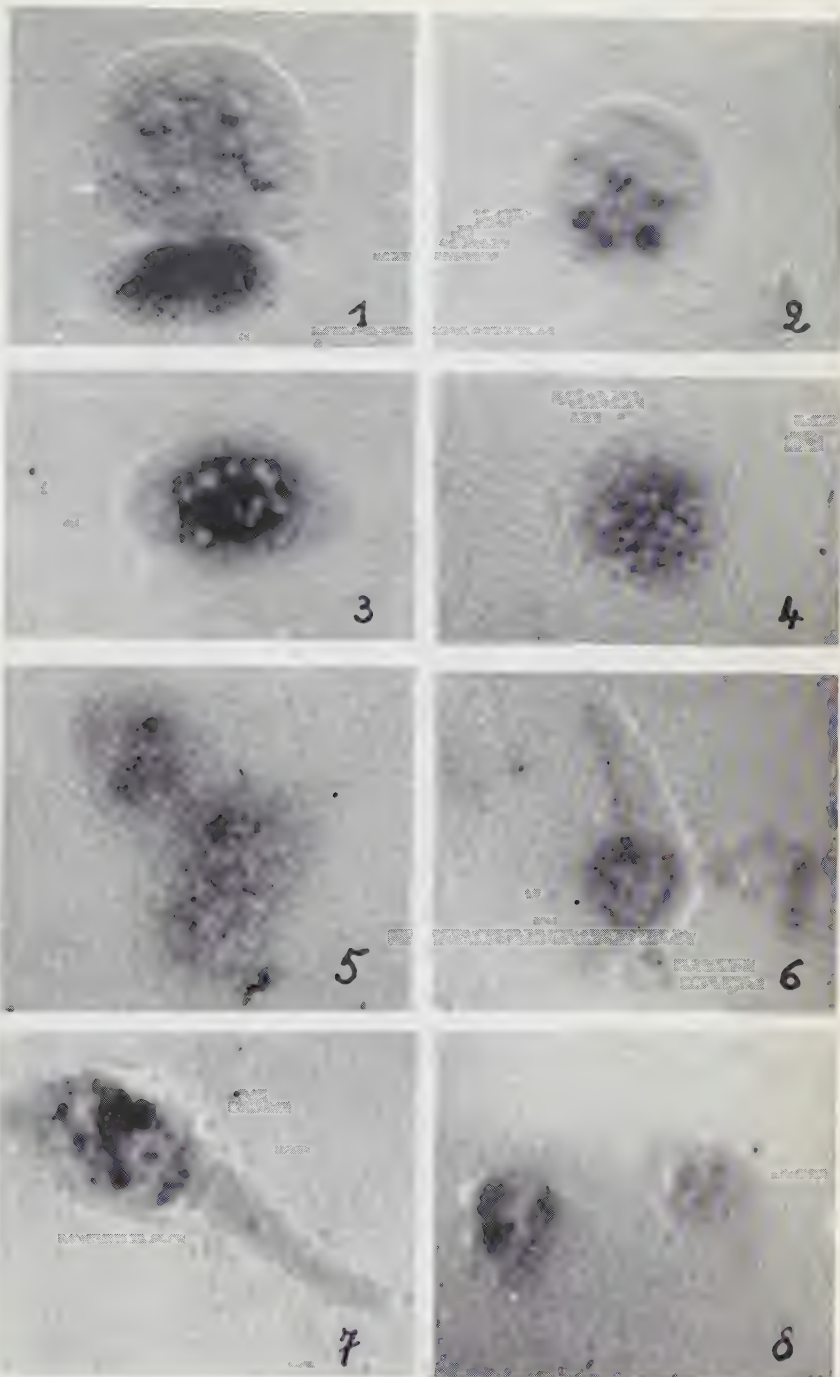


PLANCHE I.



Macchiavello, celle au bleu de méthylène, ne permettent pas de mettre en évidence les sphéropastes, mais l'imprégnation argentine après mordantage au tanin suivant la technique de Fontana-Tribondeau [46] donne des résultats satisfaisants. Pendant les quatre à cinq premières minutes, on n'aperçoit que des formes bacillaires noir intense. Peu à peu, elles s'épaississent et se raccourcissent, quelques-unes se renflent en leur milieu ou se massuent à une extrémité. Des différences dans la capacité de réduction de l'argent deviennent manifestes. Alors que de nombreuses bactéries sont uniformément teintées en brun clair, d'autres prennent un aspect bigarré, par endroits brun clair, par endroits noir. A partir de la sixième minute environ, se constituent les sphéropastes et les formes en massue ou en citron. Leur coloration n'est jamais homogène mais constituée de zones jaune clair et brun foncé alternant ou en damier.

A partir de la dixième minute, les modifications de forme paraissent stabilisées mais le pouvoir réducteur continue à décroître. Puis quelques éléments parmi les plus clairs commencent à s'altérer, ils prennent un aspect déchiqueté et leur contour devient imprécis. Ultérieurement, on assiste à la destruction totale du corps bacillaire ; les sphéropastes et les formes renflées ou en citron disparaissent les uns après les autres comme progressivement rongés. Il persiste des masses informes, des filaments, des granulations en amas, qui permettent d'évoquer encore la bactérie dont elles proviennent. Vers la fin de la première heure, les bactéries ont disparu totalement, à l'exception de quelques-unes qui se colorent toujours intensément et noir et ont conservé leur aspect normal.

Les observations réalisées au microscope électronique concordent remarquablement avec les précédentes. La seule altération perceptible pendant les six premières minutes porte sur le protoplasme qui s'éclaircit par zones. En réalité, ce type d'altération ne peut être tenu pour spécifique et se manifeste chaque fois que des bactéries subissent une agression quelconque, même si celle-ci n'est pas suffisante pour altérer leur viabilité [12, 29].

La planche I montre l'aspect des sphéropastes et des formes en massue ou en citron, qui apparaissent à partir de la sixième minute ; on voit combien elles sont transparentes aux électrons. Cette transparence ne cesse d'augmenter, aussi bien chez les bactéries qui ont conservé leur forme initiale que chez celles qui se sont transformées. Elle se fait par zones, en damier. Souvent des granules isolés ou groupés par deux, trois, quatre ou plus, persistent longtemps et tranchent sur le reste du corps bactérien qui paraît vidé et sans relief. A ce stade, l'altération des parois ectoplasmiques est évidente ; les contours deviennent flous, l'épaisseur s'amenuise peu à peu au point de ne plus être marquée par

l'ombrage. On assiste manifestement à une fonte progressive de la paroi qui finit par se dissoudre complètement. Ce processus destructif s'exerce indépendamment des modifications de forme subies par les bactéries. Seul un tout petit nombre d'entre elles résistent et demeurent apparemment intactes.

L'évolution diphasique du processus destructeur que fait ressortir l'étude morphologique se retrouve dans l'observation photométrique. Un changement brusque de la vitesse de lyse se manifeste vers la dixième minute. La phase initiale correspond à celle où les bactéries conservent leur forme normale, où aucune modification structurale de la paroi ectoplasmique n'est manifeste, mais où se poursuit l'exomose du protoplasme suivant un processus que nous avons précédemment décrit, imputable peut-être à une modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique [12, 29]. L'apparition des sphéropastes coïncide exactement, semble-t-il, avec l'amorce d'une seconde phase où le processus de clarification photométrique peut être imputé à la dissolution de la paroi ectoplasmique et à la dispersion consécutive des restes du protoplasme.

2° THERMOLABILITÉ DU FACTEUR RESPONSABLE DE LA LYSE. — La résistance vis-à-vis du chauffage contrôlé permet d'individualiser deux facteurs (3) : l'un thermostable, non lytique, auquel il faut attribuer la phase initiale de la clarification, l'autre thermolabile, qui constitue le système proprement lytique, destructeur de la paroi ectoplasmique et responsable de la seconde phase photométrique de la clarification ; c'est pour désigner ce second facteur que nous proposons le nom d'*obsistine*.

La figure 2 objective les observations aux températures de 50, 56 et 62°. On note qu'après la disparition de la plus grande partie de l'activité du sérum atteinte respectivement en soixante minutes, trois minutes et une minute, le chauffage laisse persister une activité résiduelle parfaitement stable et de même valeur. La figure 3 montre que la cinétique de la variation de la densité optique de la suspension bactérienne sous l'influence de cette « activité résiduelle thermostable » se superpose exactement à celle qui représente la première phase photométrique lors de l'emploi du même sérum non chauffé. Cette notion, se trouvant confirmée par l'examen morphologique qui révèle que le facteur thermostable n'induit pas la formation de sphéropastes et se montre incapable de dissoudre les parois ectoplasmiques, permet d'attribuer au seul facteur thermolabile les propriétés lytiques.

(3) Ceci n'implique pas que chacun des facteurs soit constitué d'un élément unique.

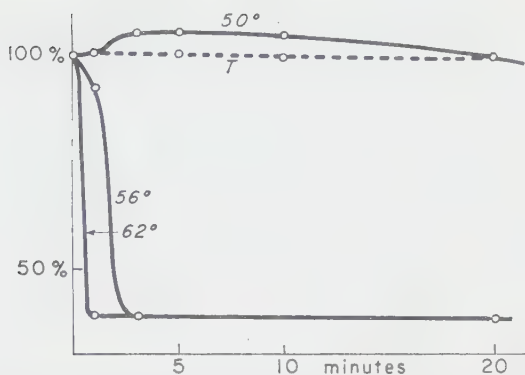


FIG. 2. — Inactivation de l'obsistine aux températures de 50°, 56° et 62°. En abscisses, le temps en minutes. En ordonnées, le pourcentage de lyse observée par rapport à celle du témoin T.

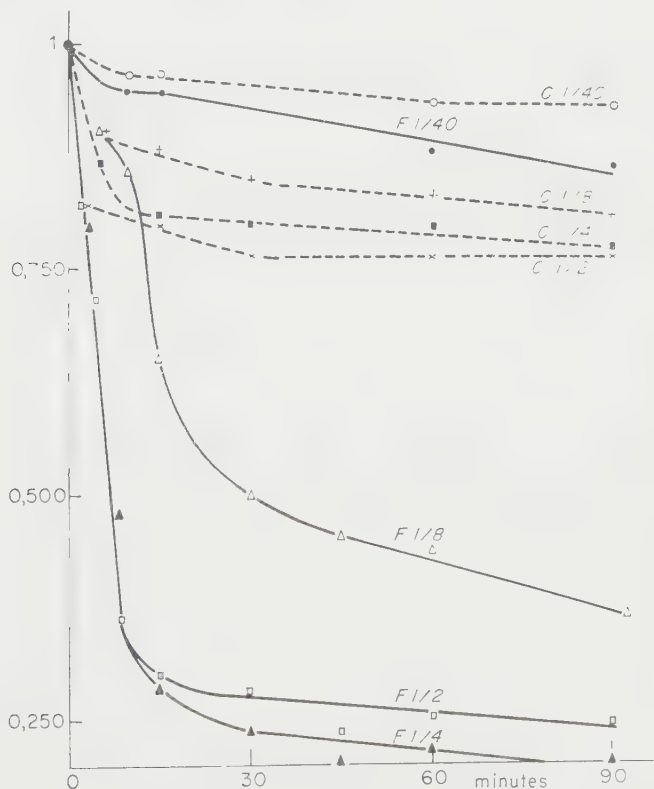


FIG. 3. — Activité Lytique exprimée en variation de la densité optique de la suspension, en fonction de diverses dilutions de sérum chauffé (C) ou non chauffé (F).

3° INFLUENCE DES IONS SUR L'ACTIVITÉ LYTIQUE. — Le sérum pur ou très peu dilué ne provoque pas la lyse des bactéries ; on l'a mis en évidence de la manière suivante.

On prépare dans de l'eau distillée une suspension bactérienne cinq fois plus concentrée que celle employée dans les conditions normalisées. On ajoute 0,2 cm³ de cette suspension à 3,8 cm³ de sérum pur. Ainsi la concentration finale en bactéries demeure la même que dans les essais habituels, et le sérum est seulement dilué au 19/20 sans addition de phosphates.

Dans ces conditions, la baisse de l'opacité rapide mais peu prononcée, qui se manifeste, est absolument identique à celle provoquée par le même sérum chauffé à 56° pendant trente minutes ;

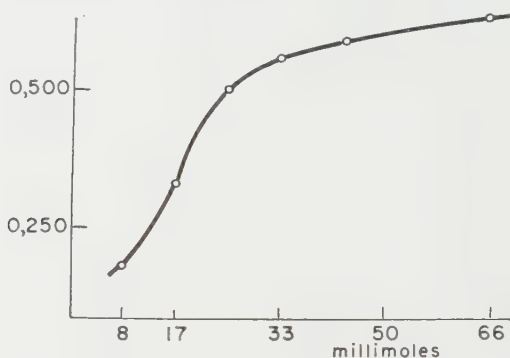


FIG. 4. — Influence de la concentration du tampon phosphate sur l'activité lytique exprimée par la densité optique des suspensions après une heure à 37°.

si l'on répète les mêmes expériences avec des sérums de plus en plus dilués, on voit se surajouter progressivement et exclusivement dans les sérums non chauffés l'action lytique vraie due à l'*obsistine*. Il apparaît donc que dans les sérums insuffisamment dilués, ce facteur est apparemment totalement inhibé, tout au moins pour les sérums très actifs.

La lyse ainsi obtenue par dilution du sérum dans de l'eau demeure cependant, à pH égal, toujours très inférieure à celle que l'on observe quand la dilution est faite avec la solution tampon phosphate. La figure 4 montre que l'activité lytique s'accroît en même temps que la concentration en phosphates, mais de manière faible pour des concentrations supérieures à 0,03 M. Un phénomène du même ordre s'observe, quoique de manière moins accentuée, quand la dilution est pratiquée avec un tampon véronal de même pH, le degré de lyse obtenu restant intermédiaire entre ceux

observés dans le cas de l'eau et dans le cas de la solution de phosphates.

On s'est demandé si ces variations n'étaient pas liées à la présence dans le sérum de cations inhibiteurs que le véronal mais surtout le phosphate pourraient chélater. On a constaté qu'il en est bien ainsi avec l'ion calcium. En tampon véronal l'addition de chlorure de calcium diminue fortement l'activité lytique ; inversement, l'addition à la concentration finale 0,001 M du sel de sodium de l'acide éthylène-diamine tétracétique (4) l'élève jusqu'à la valeur même observée en tampon phosphate, des concentrations plus faibles ou plus fortes étant nettement inhibitrices. En revanche aucune de ces conditions ne modifie « l'activité résiduelle » du sérum chauffé.

L'ion magnésium se trouve présenter des propriétés analogues. Ajouté en tampon phosphate à une concentration finale aussi faible que 0,007 M, il inhibe fortement l'obsistine. Cet effet s'accroît pour des concentrations plus élevées, au point de devenir total ; ainsi pour la concentration 0,04 M l'activité observée au photomètre se réduit à celle du facteur thermostable sur lequel l'ion magnésium paraît sans action. Comme on sait que la présence d'ions Mg^{++} est indispensable à l'activité de la properdine, on a recherché avec les techniques mêmes utilisées dans ce cas par Pillemmer [28, 50] si l'obsistine se trouvait inhibée en l'absence totale d'ions Mg^{++} . On a constaté que, si le sérum, traité par l'amberlite IR 64 dans les conditions qui permettent une extraction complète des ions bivalents, perd une part de son pouvoir lytique, l'addition de chlorure de magnésium, étudiée entre les concentrations de 0,005 et 0,125 M, ne restaure nullement l'activité primitive.

On a vérifié que l'inhibition provoquée par les ions calcium et magnésium ne provenait pas simplement de l'augmentation de la force ionique du milieu. Ainsi, en opérant en présence de chlorure de sodium 0,12 M ($\mu = 0,12$) en l'absence de tampon (la quantité de sérum introduite suffit à maintenir le pH au voisinage de 7,2), l'activité lytique est très supérieure à celle observée en son absence, alors que pour la même force ionique obtenue par l'addition de chlorure de magnésium (0,04 M), elle est complètement inhibée. L'augmentation de la force ionique paraît en elle-même favorable jusqu'à la valeur de 0,12 ; des valeurs plus élevées sont inhibitrices, pour $\mu = 0,42$ l'inhibition est totale.

4° INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITÉ LYTique. — La figure 5 objective l'influence du pH en tampon phosphate sur l'activité de l'obsistine. La zone qui permet à celle-ci de se manifester est très étroite, le pH optimum est au voisinage de 7.

(4) Versène ou Complexon III.

5° INFLUENCE DE LA DILUTION DU SÉRUM SUR L'ACTIVITÉ LYTIQUE. — On a vu (§ 3) que le sérum pur n'exerce qu'une faible activité lytique sur les bactéries, mais quand on opère sur des sérums dilués par la solution tampon phosphate, c'est-à-dire en l'absence de calcium ionisé, on provoque toujours la lyse et celle-ci est d'autant plus accentuée que le sérum est plus concentré (fig. 1).



FIG. 5.

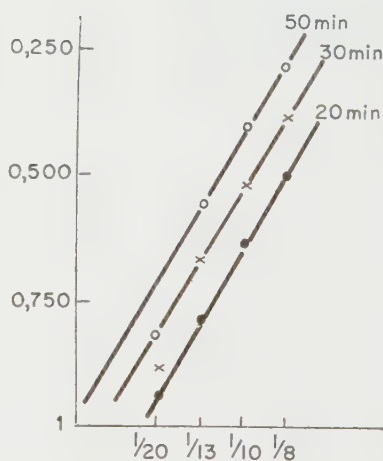


FIG. 6.

FIG. 5. — Influence du pH sur l'activité lytique. En abscisses les pH, en ordonnées les valeurs proportionnelles à l'intensité de la lyse observée en trente minutes à 37°.

FIG. 6. — Variation de l'activité lytique mesurée par la densité optique de la suspension après vingt, trente, cinquante minutes, en fonction de la dilution du sérum.

La détermination des vitesses initiales de lyse ne peut constituer malheureusement une « mesure » de l'activité lytique du fait qu'interfère à ce stade le facteur thermostable ; cependant, dans une zone convenable de dilutions du sérum, il existe une excellente proportionnalité entre celles-ci et l'intensité de la lyse mesurée au bout d'un temps donné, pourvu que celui-ci soit supérieur à vingt minutes (fig. 6). Cette propriété peut être utilisée pour le dosage de l'activité lytique, mais l'appréciation du degré de lyse devra fou-

jours être effectuée sur trois dilutions au moins de sérum, car il est indispensable de vérifier que l'on se trouve bien dans la zone de proportionnalité.

6° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN BACTÉRIES SUR L'ACTIVITÉ LYTIQUE. — Pour cette étude, le protocole expérimental fut le suivant :

On réalise tout d'abord, dans du tampon phosphate, une suspension bactérienne telle que diluée dix fois, elle présente une densité optique de 0,390 ; puis des suspensions six fois, quatre fois, trois fois et deux

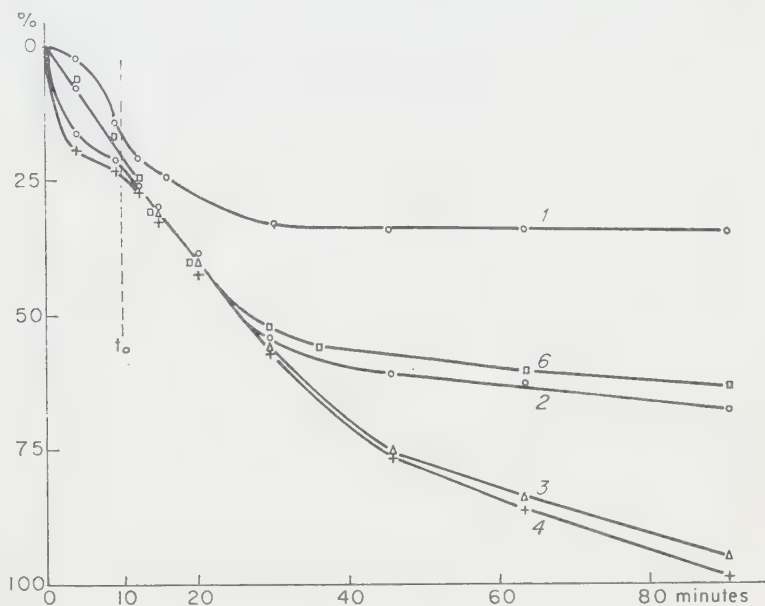


FIG. 7. — Influence de la concentration en bactéries sur l'activité lytique. En abscisses, le temps en minutes. En ordonnées, le pourcentage de lyse par rapport au témoin.

fois moins concentrées. On opère alors avec chacune d'elle dans les conditions normalisées, notamment le sérum se trouvant finalement dilué au 1/4.

La figure 7 fait ressortir les faits principaux. Les modifications de la vitesse initiale sont faibles ; cependant, au bout de dix minutes, c'est-à-dire sensiblement au moment où devient manifeste la lyse véritable due au facteur thermostable, les vitesses d'évolution commencent à se différencier nettement, suivant la concentration microbienne utilisée ; il existe notamment une concentration

microbienne pour laquelle la lyse apparaît maximum, aussi bien par la vitesse d'évolution que par le degré de clarification finalement atteint. Il est remarquable, en effet, que le processus de lyse atteigne en quelques heures un palier qui ne sera pas dépassé aussi longtemps qu'on attende, et que ce palier est d'autant plus élevé que la dilution du sérum est plus grande. Cette observation n'est pas en faveur d'un mécanisme enzymatique, ni non plus le fait que la vitesse de lyse diminue si on augmente suffisamment la concentration en bactéries (substrat) ; en effet, dans le cas d'un enzyme, pour une concentration donnée de celui-ci, la vitesse de lyse maximum étant atteinte, l'élévation de la concentration en substrat ne la modifie nullement.

Il est possible d'utiliser ces propriétés pour comparer l'activité lytique de sérums divers. Pour une dilution donnée des sérums dans du tampon phosphate (au quart par exemple), on détermine quelle est la concentration de bactéries qui permet d'observer en valeur absolue la lyse maximum.

7° FRACTIONNEMENT PAR LA DIALYSE. — La nécessité de comparer l'obsistine à la properdine nous a conduits à dialyser du sérum sanguin contre du tampon acétate de sodium-acide acétique 0,02 M de pH 5,5, c'est-à-dire dans des conditions qui entraînent à la fois la précipitation de la properdine, de C'3 et des euglobulines [50]. On a constaté que cette fraction qui précipite, dissoute en tampon phosphate, ne possède aucune activité lytique au contraire du surnageant dans le sac de dialyse, qui manifeste une activité partielle. Le mélange des deux fractions dans des proportions relatives correspondant à celles où elles se trouvent dans le sérum, restaure l'activité lytique primitive.

8° TENTATIVES D'IDENTIFICATION DU FACTEUR THERMOLABILE. — On s'est attaché à comparer les propriétés de l'obsistine à celles du lysozyme, de la properdine, du complément et des anticorps.

Obsistine et lysozyme. La présence de lysozyme dans le sérum humain est facile à mettre en évidence par la lyse de *Micrococcus lysodeikticus*. Nous avons vérifié que cette activité lytique très spécifique persiste intégralement après un chauffage du sérum quinze minutes à 56°, alors que l'activité lytique vis-à-vis de *E. typhi* disparaît complètement ; les deux facteurs en cause paraissent donc différents. Si l'on procède à l'extraction du lysozyme contenu dans le sérum par une double extraction à 0° sur *Sarcina flava*, suivant une technique que nous avons déjà décrite [8], on constate que 82 p. 100 du pouvoir lytique vis-à-vis des sarcines disparaissent, et seulement 40 p. 100 du pouvoir lytique vis-à-vis d'*E. typhi*. Inversement, l'addition de lysozyme d'œuf au sérum ainsi traité n'augmente nullement ce dernier.

Comme on sait que le lysozyme est susceptible de provoquer la lyse de bactéries à Gram négatif après que celles-ci aient subi *au préalable* une sensibilisation par des procédés divers (traitement par des détergents, l'acide éthylène-diamine-tétracétique, le chauffage ménagé [11], une résine échangeuse de cation [40 bis]), on s'est demandé s'il n'existerait pas dans le sérum un facteur thermostable remplissant un rôle sensibilisant analogue. Dans ce but on a traité les bactéries pendant cinq puis dix minutes par du sérum humain débarrassé du lysozyme. A ce stade, la lyse est encore peu accentuée ; on centrifuge et recueille les bactéries. Celles-ci sont remises en suspension dans du tampon phosphate. On constate que la lyse ne se poursuit pas et l'addition de concentrations diverses de lysozyme (1 à 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) ne la restaure nullement.

Obsistine et properdine. Si l'on met en présence à 37° du sérum actif et une concentration suffisante de bactéries (*Eberthella typhi* ou *Shigella flexneri*), on constate après centrifugation que toute activité lytique a disparu dans le surnageant. Malgré de multiples essais, il n'a pas été possible d'obtenir l'élution du principe actif que l'on suppose simplement adsorbé sur les bactéries. L'addition de l'endotoxine glucidolipidique préparée à partir des mêmes bactéries par la méthode de Boivin inhibe également totalement l'obsistine.

L'affinité de l'obsistine pour le zymosan paraît différente de celle de la properdine. On sait que celle-ci s'extrait facilement du sérum en se fixant à 17° sur le zymosan (4 mg/cm^3) d'une manière pratiquement totale en soixante-quinze minutes [40] ; or, deux adsorptions consécutives sur du zymosan frais ne provoquent aucune diminution du pouvoir lytique vis-à-vis d'*E. typhi*. En revanche, si on opère à 37° dans des conditions où le complexe properdine-zymosan inactive le troisième composant du complément (C'3), toute activité lytique disparaît.

Obsistine et anticorps. L'obsistine est manifestement différente des anticorps, mais si elle représente un système complexe, il est possible que les anticorps y jouent un rôle. Pour mettre ceci éventuellement en évidence, on a saturé des bactéries (*E. typhi* O-901) par des anticorps spécifiques provenant d'un immunsérum de lapin agglutinant au 1/80 000 et d'un sérum de convalescent de typhoïde agglutinant au 1/800 (agglutinations O). Les bactéries centrifugées et lavées remises en suspension dans du sérum humain normal se sont lysées exactement comme les bactéries témoins ; notamment, on n'a constaté aucune augmentation de la vitesse de lyse.

Obsistine et complément. Le sérum frais de cobaye ne possède aucune activité lytique vis-à-vis des bactéries d'épreuve. Si on en

ajoute des volumes variés (de 0,05 à 0,5 cm³), à des suspensions de bactéries saturées d'anticorps de lapin ou d'anticorps humain, on ne provoque nullement la lyse, même si on pratique une addition supplémentaire de lysozyme.

L'addition de sérum frais de cobaye à du sérum humain normal n'active nullement la lyse des bactéries d'épreuve mais au contraire la ralentit.

9° SPÉCIFICITÉ D'ACTION DE L'OBSISTINE. — Le facteur lytique thermolabile du sérum se montre actif sur diverses salmonelles mais non sur toutes. Ainsi, à côté d'*Eberthella typhi* souche O-901, il lyse *Salmonella para A* (Durazzo), *Salmonella para B* (Reading), *Escherichia coli* (*mutabile*), mais non *Salmonella para C* (Kunzen-dorf), *Salmonella newport*, *Salmonella enteritidis* (Dublin). Il est également actif sur d'autres bactéries à Gram négatif que les salmonelles, notamment sur *Shigella dysenteriae* et *Vibrio cholerae* (Z4) mais non sur *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis* (P 18) et *Pseudomonas aeruginosa*.

DISCUSSION.

Il existe donc, dans le sérum sanguin humain normal, un système capable de dissoudre la paroi ectoplasmique des bactéries de diverses espèces à Gram négatif, pour lequel nous avons proposé le nom d'obsistine. L'activité lytique est facilement suivie au photomètre; elle se manifeste par une diminution néphélométrique qui s'ajoute à celle provoquée par un autre facteur du sérum, thermostable, à action très partielle et de courte durée; mais elle ne se manifeste pleinement qu'après élimination ou chélation de certains ions, notamment des ions calcium qui se révèlent fortement inhibiteurs. La transformation des bacilles en sphéropastes [5] semble bien constituer la première manifestation morphologique de l'altération pariétale due à l'obsistine. Très thermolabile, puisqu'elle est complètement détruite par un chauffage d'une heure à 50° à pH 7,2, cette dernière apparaît constituée de deux facteurs ou groupes de facteurs, également thermolabiles, que la dialyse permet facilement de séparer, l'un individuellement inactif précipitant avec les euglobulines, l'autre partiellement actif, demeurant en solution avec le reste des protéines, le mélange des deux fractions restituant l'activité initiale. Ce système dont on peut supposer qu'il joue un rôle dans l'autarcèse, est étroitement soumis à l'activité des ions H⁺, le pH optimum se trouvant au voisinage de 7; mais les caractères de la cinétique d'activité ne sont pas ceux d'un enzyme.

Quoique les facteurs antimicrobiens du sang aient fait l'objet

d'importantes études (5), on manque cependant de précisions sur le cas particulier des bactériolysines, et spécialement sur celles qui se montreraient actives sur des bactéries à Gram négatif. Bien que la thermostabilité et la spécificité d'action du *lysozyme* rendissent peu probable que celui-ci fût en cause, nous avons expérimentalement écarté son intervention éventuelle en association avec des anticorps, le complément ou le sérum complet, c'est-à-dire écarté l'intervention de systèmes analogues à ceux décrits par Amano et coll. [1, 2] ou par Muschel, Carey et Baron [32].

La β -*lysine* de Pettersson [34, 35, 36, 37, 38], qui pour cet auteur comme pour d'autres [43] serait un système à deux facteurs, quoique ceci ait été discuté [30, 33], est thermostable et agirait surtout sur les bactéries à Gram positif. Quant aux autres facteurs antimicrobiens du sérum, si l'on a parfois supposé que leur action létale impliquait la lyse des bactéries sensibles, aucune étude ne paraît avoir apporté la preuve qu'il s'agit bien d'une dispersion du protoplasme bactérien consécutive à la destruction de la paroi [41] (6).

La *bactériolyse spécifique* découverte par Pfeiffer, étudiant avec Issaëff [39] ce que devenaient les vibrions cholériques injectés dans la cavité péritonéale d'animaux en état d'immunité anticholérique active ou passive, provoque des altérations morphologiques tout à fait analogues à celles provoquées par l'obsistine. Il ne fait aucun doute que la transformation des vibrions en *granules* ne soit pas autre chose que leur transformation en *sphéroplastes* :

« Au lieu de bâtonnets incurvés mobiles qu'on avait introduits, on ne trouve plus désormais que des éléments immobiles, sphériques, ayant par conséquent l'aspect de microcoques, peu réfringents et assez ternes, n'ayant plus pour les couleurs qu'une affinité médiocre. Parfois un vibron ne fournit, en s'arrondissant, qu'un seul granule ; parfois il se découpe et en donne deux ou trois. » (Bordet, p. 345 [4].)

(5) Skarnes et Watson [48] et Shilo [46] ont réalisé récemment d'excellentes revues d'ensemble des facteurs antimicrobiens des tissus et des humeurs.

(6) C'est, par exemple, le cas de la properdine. Pillemer a écrit au sujet de l'action de cette dernière sur *Shigella dysenteriae* : « Microscopic and macroscopic inspection of these organisms showed that they lysed following incubation with either serum, or RPB and added properdin (RPB refers specifically to serum rendered deficient in properdin). This clearly shows that the properdin system is indeed bactericidal. »

Nous n'avons pas trouvé trace, dans la nombreuse bibliographie consultée, de plus grandes précisions sur les transformations morphologiques des bactéries sous l'influence du système de la properdine. En tout état de cause, l'obsistine ne saurait être identifiée à ce dernier.

Ce phénomène ne s'observe pas exclusivement sur les vibrions, bien que ce soit sur ces bactéries qu'il est le plus rapide et le plus généralisé. Dès 1896, Pfeiffer et Kolle devaient le réaliser pour *Eberthella typhi*, et ont comparé la dissolution de celle-ci dans le péritoine à celle d'un morceau de sucre dans l'eau ; après s'être gonflés légèrement, les bacilles semblent véritablement se déliter peu à peu dans le liquide péritonéal, sans nécessairement passer préalablement par l'état de sphéroplaste.

Mais cette analogie d'action sur la morphologie ne traduit pas nécessairement une identité de nature des facteurs mis en cause. On sait, en effet, que la transformation de bacilles en sphéroplastes peut être obtenue de manières très diverses. On l'observe au cours de l'action du lysozyme sur les bacilles à Gram positif directement lysables, lorsque les conditions physicochimiques sont favorables [40, 52], mais également sur des bactéries non directement lysables lorsqu'on opère en présence d'acide éthylène-diamine-tétracétique [9, 17, 25, 54] ou de polymyxine [50]. Des sphéroplastes se forment également au cours de l'autolyse de diverses espèces de *Bacillus* [45] et d'*Escherichia coli* [34] ou sous l'effet de l'adsorption massive de bactériophages inactivés [6] ou sous celui d'extraits leucocytaires [2] ; mais il s'en forme également par un mécanisme tout à fait différent sous l'influence de la pénicilline.

Récemment, Muschel, Carey et Baron ont obtenu le même phénomène sur *Escherichia coli* et *Eberthella typhi* en forme R, sous l'action du sérum frais et normal d'homme ou de cobaye. *Eberthella typhi* en forme S (souche O-901) est réfractaire, mais la transformation en sphéroplastes s'obtient cependant sous l'effet conjugué d'antisérum, de complément et de lysozyme.

L'école japonaise d'Osaka a repris l'étude de la bactériolyse spécifique obtenue *in vitro* et a attiré l'attention la première sur la possibilité de l'accélérer par le lysozyme [22, 25, 27, 45] ; malheureusement les auteurs ne semblent pas avoir soupçonné la possibilité de l'existence, dans les sérums, de bactériolysines non spécifiques et, sans précautions expérimentales suffisantes, ont attribué dans tous les cas la lyse observée au jeu de l'association anticorps-complément.

Il paraît possible d'affirmer que le système de l'obsistine est tout à fait distinct de celui qui entre en jeu dans la bactériolyse spécifique. On sait, en effet, depuis les expériences mémorables de Bordet [3], que celle-ci met en jeu deux groupes de facteurs individuellement inactifs. L'un des deux est thermostable et représente la réponse immunitaire, étroitement spécifique, de l'organisme préparé par des injections d'antigène ; l'autre, inactivé par chauffage à 56°, existe dans le sérum frais de tous les animaux normaux, si bien que l'addition d'une petite quantité de

celui-ci (notamment de sérum de cobaye). restaure l'activité lytique de l'immunsérum chauffé. Or, si l'obsistine paraît également un système complexe d'au moins deux facteurs, ceux-ci sont tous les deux thermolabiles, se rencontrent chez les sujets non préparés, manifestent une spécificité très large et l'addition de sérum frais de cobaye ne restaure nullement l'activité du sérum chauffé à 56°. De même, on n'a pas réussi à reconstituer un système bactériolytique pour la souche d'épreuve (*E. typhi* O-901) en conjuguant l'action d'anticorps spécifiques d'homme ou de lapin et de sérum frais de cobaye.

Les auteurs japonais ont également mis en évidence l'existence dans les leucocytes de divers facteurs antimicrobiens, notamment d'un facteur thermolabile (*leucozyme C*), insoluble à pH 5,2, capable de transformer *Escherichia coli* B en sphéropastes et de dissoudre complètement les parois isolées de ces bactéries [2]. Ces éléments sont malheureusement insuffisants pour permettre la comparaison avec l'obsistine.

En revanche, il paraît exister une certaine similitude entre l'obsistine et les *bactériolysines non spécifiques* du sérum, dont l'existence est connue depuis fort longtemps, mais dont l'étude paraît avoir été négligée au profit des bactériolysines spécifiques, sans doute à cause de leur manque d'utilité pour le diagnostic sérologique des affections bactériennes. Voici par exemple comment s'exprimaient Kolle et Hecht en 1918 dans leur traité classique de bactériologie expérimentale [24] :

« Bien que le sang puisse contenir à l'état normal des substances capables d'exercer une action dissolvante sur les bactéries, on réserve généralement le nom de bactériolysines aux bactériolysines spécifiques. En effet, la spécificité n'est pas un caractère des bactériolysines du sang normal, qui peuvent agir sur les espèces bactériennes les plus diverses ; mais c'est d'elles cependant que dérivent les bactériolysines spécifiques, car elles ont les unes et les autres la même constitution. » (p. 132.)

Ailleurs ils s'expriment encore ainsi :

« Les bactériolysines sont des anticorps spécifiques ; mais, comme on en rencontre également dans la plupart des sérums normaux, la spécificité d'un sérum bactériolytique ne peut être établie que par un titrage quantitatif. La meilleure méthode pour la démonstration des bactériolysines est celle qu'a indiquée Pfeiffer... On peut aussi démontrer la présence des bactériolysines par l'expérience *in vitro* ; mais les résultats obtenus avec cette méthode sont moins réguliers et plus incertains que ceux que fournit l'expérimentation sur l'animal, à laquelle on doit par conséquent avoir recours de préférence.

» Pour certaines bactéries, cependant, la spécificité des bactériolysines n'est pas telle qu'elle permette de les différencier sûrement de certaines espèces voisines. C'est ainsi qu'un sérum antityphoïdique pourra exercer une action bactériolytique prononcée sur certaines races de colibacilles.

De même les divers représentants du groupe des bacilles paratyphiques et du bacille de Gärtner ne peuvent être différenciés par l'expérience de Pfeiffer. Mais d'une façon générale, ces faits n'ont pas, pour la pratique, des inconvénients bien considérables. » (p. 137.)

On peut résumer cet ensemble de données, en notant qu'il existe presque certainement dans le sang plusieurs processus différents, capables de réaliser la bactériolyse de bactéries à Gram négatif, la transformation en sphéroplastes se révélant en corrélation avec les premiers stades de l'altération des parois. L'un fait entrer en jeu les anticorps, le complément et peut-être le lysozyme ou des enzymes analogues, un autre, dont l'existence est connue depuis très longtemps, n'impliquant aucun de ces éléments, paraît tout à fait indépendant du premier. Mais l'imprécision des observations ne permet pas de savoir dans quelle mesure l'obsistine peut lui être identifiée.

La connaissance des facteurs antimicrobiens du sang, non bactériolytiques, est beaucoup plus avancée, mais il est vraisemblable que certains d'entre eux ont été découverts et décrits plusieurs fois ; il est possible que l'obsistine, caractérisée par ses propriétés lytiques vis-à-vis de bactéries à Gram négatif, s'identifie à quelque facteur antimicrobien déjà connu, caractérisé jusqu'ici par exemple par une action létale vis-à-vis des bactéries, ou par la propriété de neutraliser l'action nécrotique des endotoxines sur les sarcomes expérimentaux, par la propriété de détoxifier les endotoxines bactériennes, ou bien par sa capacité d'augmenter la résistance des organismes d'épreuve vis-à-vis de l'infection expérimentale, ou encore par toute autre propriété biologique. Il paraît ainsi indispensable de discuter soigneusement les rapports qui pourraient exister entre l'obsistine et les principaux facteurs antimicrobiens du sang, notamment la *properdine* de Pillemer, l'« endotoxin-detoxifying-component » de Landy et le *facteur bactéricide* de Wegwood.

L'obsistine et la properdine sont distincts par toute une série de caractères. Il apparaît tout d'abord que l'obsistine, dont la thermolabilité est plus grande que celle de la properdine, ne s'adsorbe pas comme celle-ci à 17° sur le zymosan. Ce caractère ne suffit pas cependant à différencier les deux systèmes, car Pillemer admet qu'au moins pour certains sérums, le traitement par le zymosan à 17° laisse subsister suffisamment de properdine pour qu'une activité résiduelle soit décelable et il est nécessaire dans ces cas de répéter le traitement à 37° pour l'éliminer [40]. Il n'est pas certain qu'une pétition de principe n'ait pas été introduite dans le raisonnement de Pillemer puisque pour prouver que la properdine est responsable des propriétés antimicrobiennes du sérum, il en vient à modifier les caractéristiques précédemment

admises pour définir la properdine. Quoi qu'il en soit, les essais de réactivation d'un sérum qui a perdu ses propriétés lytiques par adsorption à 37° sur le zymosan, à l'aide des fractions obtenues par dialyse du même sérum, permettent d'affirmer la non-identité de l'obsistine et de la properdine. On a vu, en effet, que la fraction des euglobulines, qui contient à la fois la properdine et C'3, ne restaure nullement l'activité lytique du sérum inactivé par adsorption à 37° sur le zymosan, au contraire du surnageant du sac de dialyse qui cependant ne contient plus ni properdine ni C'3.

Le comportement vis-à-vis de l'ion magnésium permet les mêmes conclusions. Alors que cet ion est indispensable à l'activité de la properdine [28, 49], il ne l'est nullement pour l'obsistine, pour laquelle il se comporte au contraire comme un inhibiteur.

La différenciation entre l'obsistine et le *principe détoxifiant* du sérum est plus délicate. Lorsqu'on mélange du sérum ou du plasma sanguin à une solution d'endotoxine bactérienne, on observe, chez l'animal auquel le mélange est injecté, ou bien une augmentation de l'intensité de la réaction hyperthermique, ou bien tout au contraire une diminution. En fait, ces deux effets sont dissociables [13, 14]; le principe responsable du premier effet, se manifeste après un très court contact avec l'endotoxine et ne paraît pas de nature enzymatique, alors que le second nécessite une incubation prolongée et paraît de nature enzymatique. Ce facteur détoxifiant est présent notamment dans le sérum humain [23], s'adsorbe sur le zymosan et se montre actif non seulement sur le complexe glucidolipidique endotoxique mais sur le constituant lipidique isolé, sur le « lipide A » de Westphal dont il abolit l'effet pyrogène et l'effet leucopénique [53].

Pour étudier ce facteur détoxifiant, Landy et coll. ont préféré faire appel à la propriété des endotoxines de provoquer la nécrose du sarcome expérimental sur la souris; l'activité détoxifiante est alors appréciée par la diminution de cette propriété. Ils ont ainsi établi [26, 47], que l'activité de l'« endotoxin-detoxifying-component », plus simplement EDC, se manifeste entre les pH de 7 et 9, mais non au-dessous de pH 6 et nécessite une température d'au moins 30°. L'EDC, thermolabile, est détruit par un chauffage d'une heure à 56° mais ne s'altère dans le sérum conservé à 4° qu'au bout de plusieurs mois. L'EDC est fortement inhibé par les ions Ca^{++} à des concentrations de l'ordre de celles du sérum [41], de même que par les ions Mg^{++} , Mn^{++} et Ba^{++} , alors que les ions Co^{++} , Cu^{++} et Fe^{++} sont sans action. Au cours de la dialyse du plasma citraté contre de l'eau, l'EDC ne se rencontre pas dans la fraction euglobulinique, mais bien dans la fraction protéique qui n'a pas précipité dans le sac de dialyse. L'activité retrouvée est en réalité très partielle, mais elle peut être restaurée intégralement si on reconstitue des concentrations

physiologiques en phosphate et en bicarbonate. Il faut noter, enfin, que l'EDC n'est pas adsorbable sur le zymosan à 17°. Malheureusement, les auteurs n'indiquent pas s'il l'est à 37°. Pour eux, ce caractère permet de différencier l'EDC de la properdine, cette conclusion se trouvant par ailleurs confirmée par l'inefficacité du sérum de lapin antiproperdine et la non-intervention des facteurs du complément.

Dans l'ensemble, ces propriétés de l'EDC sont analogues à celles de l'obsistine, notamment la thermolabilité, l'influence de la concentrations en ions H^+ , l'effet inhibiteur marqué des ions Ca^{++} et Mg^{++} , l'absence de participation des éléments du complément et la non-adsorption sur le zymosan à 17°. On comprendrait aisément, d'autre part, que le même facteur puisse être doué à la fois de propriétés lytiques et détoxifiantes, puisque l'endotoxine est un constituant essentiel de la paroi. Le comportement au cours de la dialyse est analogue ; le liquide du sac de dialyse surnageant les euglobulines conserve une activité lytique comme il conserve un effet détoxifiant, mais seulement de manière partielle. Cependant, le mélange, à cette fraction, des euglobulines remises en solution suffit à restaurer l'activité lytique. Il est donc tout à fait possible que l'obsistine et le facteur détoxifiant du sérum ne soient qu'un seul et même système.

Dans ces conditions, l'obsistine doit être rapprochée du facteur bactéricide de Wedgwood [51], actif sur des espèces à Gram négatif résistantes à la properdine, que cet auteur considère comme peut-être identique à l'EDC de Landy. En revanche, elle paraît bien différente de la « phosphatase » du sérum sanguin étudié par Rowley et ses collaborateurs [42, 43], capable de détacher des phosphates inorganiques à partir de l'endotoxine ; il s'agit en effet d'un enzyme, nécessitant la présence d'ions Mg^{++} .

Il résulte donc que l'obsistine ne saurait être confondue avec le lysozyme, la properdine ni les bactériolysines spécifiques, mais constitue un système peut-être identique à celui étudié par Landy, qui détoxifie les endotoxines, au facteur antimicrobien de Wedgwood, et aux bactériolysines non spécifiques dont l'existence est connue depuis le début du siècle.

CONCLUSIONS.

Le sérum humain normal contient un système que nous avons désigné sous le nom d'*obsistine*, capable de détruire la paroi ectoplasmique de bactéries à Gram négatif. Cette lyse ne présente pas les caractères cinétiques d'un processus enzymatique. Elle est fortement inhibée par les ions calcium aux concentrations sanguines et également par les ions magnésium, même à des concen-

trations aussi faibles que 0,005 M. L'activité, qui ne se manifeste que dans une zone étroite de pH, se révèle maximum au voisinage de 7.

L'obsistine est constituée d'au moins deux facteurs, également thermolabiles, l'un précipitant au cours de la dialyse avec les euglobulines et individuellement totalement inactif, l'autre partiellement actif qui demeure en solution avec les autres protéines. Le mélange de ces deux fractions restaure l'activité lytique initiale. Les anticorps spécifiques, le complément dans son ensemble, le lysozyme et la properdine paraissent étrangers à ce système, qu'il convient en revanche de rapprocher des bactériolysines non spécifiques dont l'existence est connue depuis longtemps, du facteur détoxifiant du sérum décrit par Landy, et peut-être du facteur bactéricide décrit par Wedgwood.

SUMMARY

THE LYTIC PROPERTIES OF SERUM.

I. CHARACTERIZATION OF A FACTOR PRESENT IN NORMAL HUMAN SERA : THE *obsistin*.

Normal human sera contain a system able to lyse the ectoplasmic cell-wall of Gram-negative bacteria, and named « *obsistin* » by the authors. This lysis does not show the cinetics of an enzymic process ; it is markedly inhibited by normal serum concentrations of Ca ions and by Mg ions even at very low concentrations (0,005 M). The system is active in a very narrow pH range (optimum = pH 7).

Obsistin is constituted of at least two factors, both of them thermolabile ; one precipitates during dialysis with euglobulins and is alone totally inactive ; the other, partially active, remains in solution with the other proteins. The mixing of these two fractions restores the lytic activity.

This system seems to be different from the specific antibody, the complement, the lysozym and the properdin, and appears to be related to non specific bacteriolysins, to the detoxifying serum factor described by Landy, and may be to the bactericidal factor described by Wedgwood.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMANO (T.), INAI (S.), SEKI (Y.), KASHIBA (S.), FUJIKAWA (K.) et NISHIMURA (S.). *Med. J. Osaka Univ.*, 1954, **4**, 401.
- [2] AMANO (T.), SEKI (Y.), FUJIKAWA (K.), KASHIBA (S.), MORIOKA et ICHIKAWA (S.). *Med. J. Osaka Univ.*, 1956, **7**, 245.

- [3] BORDET (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1895, **9**, 462.
- [4] BORDET (J.). *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. 2^e éd., Masson, édit., Paris, 1939.
- [5] BRENNER (S.), DARK (F. A.), GERHARDT (M. H.), JEYNES (M. H.), KANDLER (O.), KELLENBERGER (E.), KLIENEGER-NOBEL (E.), MAC QUILLLEN (K.), RUBIOHUERTOS (M.), SALTON (M. R. J.), STRANGE (R. E.), TOMCSIK (J.) et WEIBULL (C.). *Nature*, 1958, **181**, 1713.
- [6] CAREY (W. F.), SPILMAN (W.) et BARON (L. S.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 543.
- [7] COLOBERT (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 1155.
- [8] COLOBERT (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, suppl. n° 1, 135.
- [9] COLOBERT (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 1904.
- [10] COLOBERT (L.). *Résumés VII^e Congrès Microbiol., Stockholm*, 1958, **25 d**, 419.
- [11] COLOBERT (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 156.
- [12] COLOBERT (L.) et LOUISOT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 463.
- [13] CLUFF (L. E.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1958, **102**, 8.
- [14] CLUFF (L. E.) et BENNETT (I. L.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1957, **101**, 281.
- [15] DARK (F. A.) et STRANGE (R. E.). *Nature*, 1957, **180**, 759.
- [16] DUMAS (J.) et coll. *Bactériologie Médicale*, Flammarion, édit., Paris.
- [17] FRASER (D.) et MAHLER (H. R.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **69**, 166.
- [18] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 528.
- [19] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 239.
- [20] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 601.
- [21] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 117.
- [22] HAHN (F. E.) et CIAK (J.). *Science*, 1957, **125**, 119.
- [23] HEGEMAN (F.). *Zbl. Bakt.*, 1957, **170**, 71.
- [24] KOLLE (W.) et HETSCH (H.). *La bactériologie expérimentale appliquée à l'étude des maladies infectieuses*, 3^e édit. franç., Doin, édit., Paris, 1918.
- [25] KARUNAIRATNAM (M. C.), SPIZIZEN (J.) et GEST (H.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **29**, 649.
- [26] LANDY (M.), SKARNES (R. C.), ROSEN (F. S.), TRAPANI (R. J.) et SHEAR (M. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1957, **96**, 744.
- [27] LEDERBERG (J.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1956, **42**, 574.
- [28] LEPOW (I. H.), PILLEMER (L.) et RATNOFF (O. D.). *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 277.
- [29] LOUISOT (P.). *Thèse de Médecine*, Lyon, 1958.
- [30] MACKIE (T. J.) et FINKELSTEIN (M. H.). *J. Hyg.*, 1932, **32**, 1.
- [31] MITCHELL (P.) et MOYLE (J.). *Nature*, 1956, **178**, 993.
- [32] MUSCHEL (L. H.), CAREY (W. F.) et BARON (L. S.). *J. Immunol.*, 1959, **82**, 38.
- [33] MYRVIK (Q. N.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1956, **66**, 391.
- [34] PETTERSSON (A.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1924, **40**, 43.

- [35] PETTERSSON (A.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1926, **48**, 233.
- [36] PETTERSSON (A.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1927, **54**, 292.
- [37] PETTERSSON (A.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1935, **86**, 407.
- [38] PETTERSSON (A.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1936, **88**, 210.
- [39] PFEIFFER (R.) et ISSAEFF. *Z. Hyg.*, 1894, **17**, 355.
- [40] PILLEMER (L.). *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, **17**, 526.
- [40 bis] REPASKE (R.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 225.
- [41] ROSEN (F. S.), SKARNES (R. C.), SHEAR (M. J.) et LANDY (M.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 701.
- [42] ROWLEY (D.), ALI (W.) et JENKIN (C. R.). *Lancet*, 1956, **1**, 366.
- [43] ROWLEY (D.), ALI (W.) et JENKIN (C. R.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1958, **39**, 90.
- [44] ROWLEY (D.), HOWARD (J. G.) et JENKIN (R. C.), *Lancet*, 1956, **1**, 366.
- [45] SHEININ (R.) et MAC QUILLEN (K.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1959, **31**, 72.
- [46] SHILO (M.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1959, **13**, 255.
- [47] SKARNES (S. C.), ROSEN (F. S.), MURRAY (M. D.), SHEAR (M. J.) et LANDY (M.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 685.
- [48] SKARNES (R. C.) et WATSON (D. W.). *Bact. Rev.*, 1957, **21**, 273.
- [49] WARDLAW (A. C.) et PILLEMER (L.). *J. exp. Med.*, 1956, **130**, 553.
- [50] WARREN (G. H.), GRAY (J.) et YURCHENKO (J. A.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 788.
- [51] WEDGWOOD (R. J.). *Résumés VII^e Congr. Intern. Microbiol.*, Stockholm, 1958, 190.
- [52] WEIBULL (C.). *Ann. Rev. Microbiol.*, 1958, **12**, 1.
- [53] WESTPHAL (O.), HAMMER (D.), LUDERITZ (O.), NOVOTNY (A.), EICHENBERGER (E.) et GOEBEL (F.). *Z. Naturforsch.*, 1958, **13 b**, 572.
- [54] ZINDER (N. D.) et ARNDT (W. F.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1956, **42**, 586.

NOTE SUR LE DIAGNOSTIC DE LA VARIOLE AU LABORATOIRE.

II. MÉTHODE D'INOCULATION SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE D'EMBRYON DE POULET.

par P. BRÈS, R. CAMAIN et H. DARRASSE (*)

(avec la collaboration technique de B. CARRONNIER et B. KHOURY).

(Institut Pasteur de Dakar)

Le fait que la variole règne à l'état endémo-épidémique dans les territoires africains entraîne la nécessité de posséder pour son identification au laboratoire une technique simple, peu coûteuse et rapide. L'épreuve de Paul sur la cornée de lapin ou l'inoculation au singe ne paraissent pas satisfaisantes à cet égard [1]. Par contre, l'isolement du virus par inoculation de la membrane chorio-allantoïdienne nous semble être la méthode de choix. Nous avons apprécié, outre sa simplicité, sa rapidité et sa fidélité qui, moyennant quelques précautions dont nous soulignerons l'importance, la mettent à la portée d'un laboratoire non spécialisé en virologie.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

PRÉLÈVEMENTS.

Le plus pratique est d'opérer le prélèvement en ponctionnant une demi-douzaine de vésico-pustules avec une seringue de 2 ml sur laquelle est montée une aiguille de 0,8/30 mm. Ensuite, en effectuant plusieurs manœuvres du piston, le contenu de la seringue et de l'aiguille est projeté sur un fragment de papier buvard [préalablement passé dans la flamme (1)] au fond d'un tube

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 février 1960.

(1) Ce procédé n'assure qu'une stérilité relative, mais souvent suffisante puisqu'on utilise des antibiotiques pour l'inoculation. Il est également facile de stériliser les buvards avec les tubes à 120°.

à hémolyse. Celui-ci est bouché au caoutchouc ou au liège, et, en fixant le bouchon avec un ruban adhésif, on réalise ainsi un conditionnement permettant d'éviter de répandre du virus pendant le transport ou à l'arrivée au laboratoire. Les croûtes sont simplement mises dans un tube.

La conservation des prélèvements pose des problèmes qu'il est souvent difficile de résoudre en régions tropicales. La résistance classique du virus variolique dans les croûtes ne semble pas être la règle pour toutes les souches et *a fortiori* pour le contenu des vésico-pustules. Le mieux est d'acheminer le matériel virulent dans un emballage contenant de la glace. Cependant, il est possible d'obtenir un isolement positif avec le pus de vésico-pustules déposé sur papier buvard et ayant séjourné sept jours à 30° (2). Le développement bactérien apporte alors une gêne importante à l'isolement du virus ; à 37°, il suffirait en effet de vingt-quatre heures pour que se produise une pullulation bactérienne rendant le prélèvement inutilisable. Dans une telle éventualité, pénicilline et streptomycine seront à la fois introduites dans le sac du jaune et mises au contact du virus.

INOCULATION.

Pour l'inoculation, il suffit d'ajouter 0,5 ml d'eau distillée dans le tube, et, à l'aide d'une pipette Pasteur scellée ou d'un petit agitateur, on écrase légèrement le papier buvard contre la paroi du tube. La dilution au 1/10 est obtenue en reportant 11 gouttes de suspension-mère dans XVIII gouttes d'eau distillée, et ainsi de suite pour les dilutions suivantes. On opère d'une façon analogue avec les croûtes.

La dilution de l'inoculum est très importante en ce sens qu'elle facilite le diagnostic macroscopique par l'obtention de pustules bien isolées. Avec la suspension-mère préparée comme ci-dessus et en inoculant quatre œufs pour chacune des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , on obtient en règle générale à la dilution 10^{-3} de nombreuses pustules isolées. Les membranes inoculées avec la suspension pure ou à 10^{-1} donneraient un ulcère étendu d'interprétation impossible. La virulence du contenu des vésico-pustules est assez élevée car, avec le contenu de 3 à 4 éléments éruptifs d'aspect acnéiforme, il est possible d'obtenir à la dilution 10^{-3} des membranes typiques.

Dans l'utilisation des antibiotiques, il est toujours à craindre qu'un excès soit nuisible au développement du virus et on recherche une dose minimum permettant cependant d'éliminer la surinfection bactérienne. Ainsi, pour des vésico-pustules récentes,

(2) Mc Callum et Mc Donald [4] ont fait des constatations analogues.

âgées de 48 heures : 500 U. O. de pénicilline et 0,0001 g de streptomycine dans le sac du jaune suffisent à empêcher l'infection bactérienne. Pour des vésico-pustules plus âgées ou pour des broyats de croûtes, la même dose d'antibiotiques sera introduite dans le sac du jaune, mais il est nécessaire de la renforcer en ajoutant dans la préparation de la dilution au 1/10, 5 000 U. O. de pénicilline et 0,001 g de streptomycine par millilitre. Le maximum de ces deux antibiotiques qu'on puisse mettre au contact de la suspension au 1/10 de produits varioliques semble se situer aux environs de 50 000 U. O. de pénicilline et 0,01 g de streptomycine par millilitre. Les antifongiques ne sont pas indispensables.

L'isolement du virus peut être conduit dans de bonnes conditions avec le matériel le plus simple. Une étuve d'un modèle courant utilisé en bactériologie convient parfaitement pour l'incubation des œufs à 37° avant et après leur inoculation. Les œufs de n'importe quel élevage peuvent être utilisés pourvu que l'on soit sûr de la date de leur ponte. Les œufs de 10 jours sont inoculés suivant la technique classique à l'aide d'une seringue en piquant au travers de la membrane coquillière mise à nu sur une surface de 0,5 cm de côté, pour déposer sur la membrane chorio-allantoïde, préalablement affaissée, 0,15 ml de la dilution adéquate du prélèvement. Les membranes sont prélevées soixante-douze heures après l'inoculation et soumises à un contrôle bactériologique.

Selon ces techniques, nous avons examiné un total de 230 membranes chorio-allantoïdiennes inoculées avec les produits des lésions cutanées de 22 cas de variole et de 8 cas de varicelle.

RÉSULTATS

I. — DIAGNOSTIC POSITIF.

DIAGNOSTIC MACROSCOPIQUE. — Les pustules isolées constatées après soixante-douze heures d'incubation sur les membranes inoculées avec une dilution à 10^{-2} ou 10^{-3} sont de petites dimensions, à centre opaque en relief et serties d'une auréole blanchâtre. Elles sont disposées en un semis plus ou moins régulier, tandis que la membrane est épaissie et donne l'impression d'être cartonnée.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE. — Au cours de cette étude sur 54 membranes C. A. inoculées de produits varioliques selon les modalités plus haut indiquées, nous avons retrouvé les lésions histologiques classiquement décrites.

Ces lésions vont intéresser les trois feuillets ecto, méso- et entoblastiques de la M. C. A. : inégalement réparties, elles trouvent leur gravité maxima au niveau des pustules macroscopiquement décelables.

A un faible grossissement on est d'emblée frappé par l'épaisseur générale de la membrane, qui même en dehors des pustules elles-mêmes, est double ou triple de celle d'une membrane normale, une telle augmentation étant due à l'œdème inflammatoire du mésoblaste.

Il convient d'étudier à un fort grossissement les modifications respectives de l'ectoblaste, du mésoblaste et de l'entoblaste.

A. *L'ectoblaste*. — Il comporte deux types essentiels de lésions :

1° Des pustules de taille extrêmement variable, certaines microscopiquement décelables seulement ;

2° Des plages d'épaississement uniforme plus ou moins étendues.

a) Au niveau des pustules pleinement évoluées mais non ulcérées, on note un épaississement ectoblastique maximum au centre où il peut atteindre plusieurs dizaines de strates cellulaires ; les cellules ectoblastiques témoignent là des altérations les plus diverses :

a) Ballonnisation plus ou moins vive donnant éventuellement des images en dentelle, surtout en surface et sur les bords de la pustule.

β) Nécrose oxyphile partielle ou totale avec pycnose, caryorhexis ou caryolyse ; cette nécrose intéresse plus spécialement la région centrale de l'élément pustuleux, et peut être remaniée secondairement par de l'exosérose et de l'exocytose pour aboutir à la formation de la pustule proprement dite. L'évolution de cette lésion se fera vers la desquamation de la partie nécrosée qui laissera à sa place un ulcère à bords ectoblastiques surélevés.

γ) Edification de perles ectoblastiques.

δ) Papillomatose parfois très vive avec prolifération dans le mésenchyme sous-jacent de boyaux et lobes ectoblastiques dont la description sera reprise plus loin.

b) Au niveau des plages d'épaississement uniforme, on retrouve sensiblement le même type de lésions, mais ici les images de ballonnisation et de dentelle ectoblastiques sont souvent remarquables, l'œdème interstitiel décolle l'assise génératrice ectoblastique du mésoblaste sous-jacent, ceci avec ou sans exocytose, et la totalité de l'ectoblaste épaissi desquame alors en bloc sans être fatalement intéressé par des phénomènes de nécrose. De telles zones peuvent édifier également perles, globes ou boyaux ectoblastiques.

Dans ces deux types de lésions quelques rares cellules ectoblastiques peuvent renfermer des inclusions de type Guarnieri ou Paschen-Borrel.

B. *Le mésoblaste*. — Epaissi par un vif œdème interstitiel, il manifeste un état inflammatoire et mobilisera des éléments réactionnels très divers, ceci surtout en regard des lésions ectoblastiques. Ses vaisseaux sont dilatés et, pour certains, présentent un état réactionnel de leur endothélium qui peut quadrupler l'épaisseur de cette tunique et donner au vaisseau vu en coupe tangentielle un aspect bourgeonnant.

Ces altérations s'accompagnent souvent de suffusions hémorragiques.

Les cellules réactionnelles sont des fibroblastes qui vont édifier dans la zone sous-jacente à l'ulcère une trame cellulaire orientée, trame le plus souvent noyée dans l'afflux de cellules libres, histiocytes et polynucléaires éosinophiles. Certains de ces éléments évoluent sur place vers une nécrose, d'autres sont phagocytés par des histiocytes, d'autres enfin transgressent la basale ectoblastique pour infiltrer l'ectoblaste et se collecter à son niveau en pustules où ils se mélangent aux cellules ectoblastiques nécrotiques.

On peut observer dans certaines membranes une exocytose modérée orientée vers l'entoblaste.

Dans le mésoblaste, et irradiant à partir des plages réactionnelles ectoblastiques, prolifèrent des cordons et globes ectoblastiques qui fument très profondément, parfois jusqu'au contact de l'entoblaste. L'orientation de ces éléments par rapport à la zone de prolifération ectoblastique qui leur a donné naissance n'est pas indiffé-

PLANCHE I

FIG. 1. — Préparation 3979 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. Petite pustule peu évoluée avec prolifération de l'ectoblaste s'accompagnant de nécrose de quelques cellules de ce feuillet. Réaction vive du mésoblaste, fibroblastique et surtout leuco-histiocytaire.

FIG. 2. — Préparation 4180 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. Petite pustule plus évoluée que la précédente et comportant une nécrose ectoblastique importante de toute sa région moyenne. Réaction mésoblastique très vive, leuco-histiocytaire du mésoblaste qui va de pair avec les images de prolifération et de nécrose ectoblastique. Dans les lésions non spécifiques des M. C. A. un tel jumelage n'est guère observé.

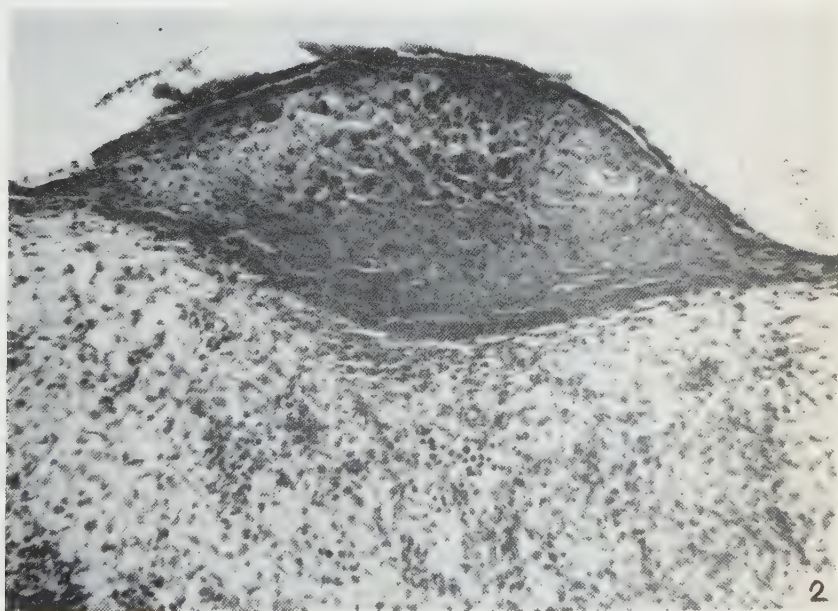
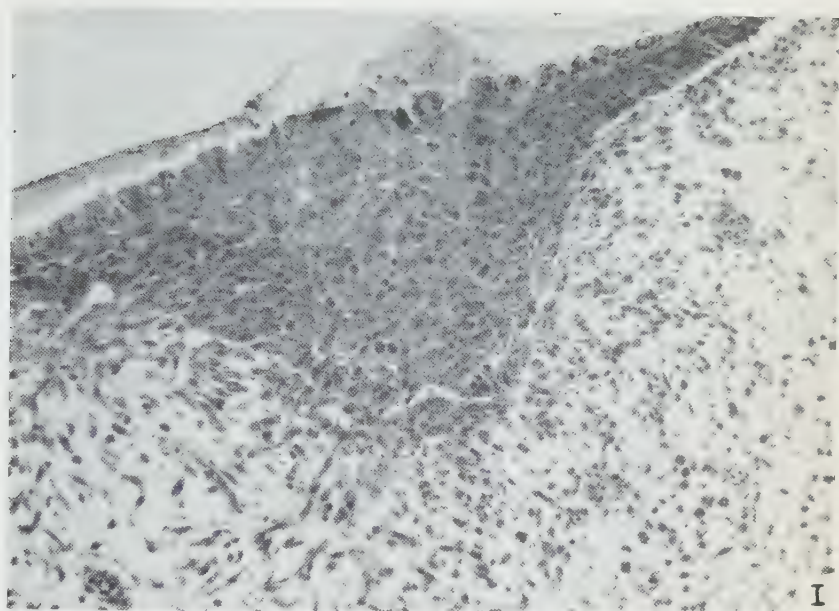


PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE II

FIG. 3. — Préparation 4349 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 250$. Détail d'une pustule. Autour de la zone de nécrose ectoblastique, les cellules du feuillet témoignent souvent d'images de nécrose oxyphile partielle de leur cytoplasme, avec présence d'inclusions oxyphiles. Entre les cellules ectoblastiques, présence de leucocytes exocytosiques.

FIG. 4. — Préparation 3881 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (2^e passage d'une souche). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. Prolifération ectoblastique avec dégénérescence ballonnisante en surface. Bourgeonnement ectoblastique rappelant les globes cornés des épithéliomas spino-cellulaires. Suffusions hémorragiques. Réaction mésoblastique à histiocytes et leucocytes.

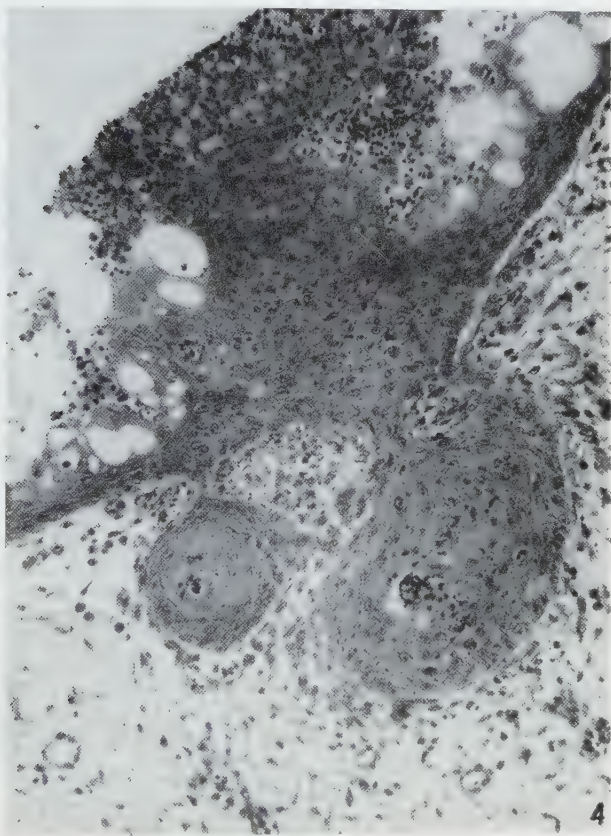
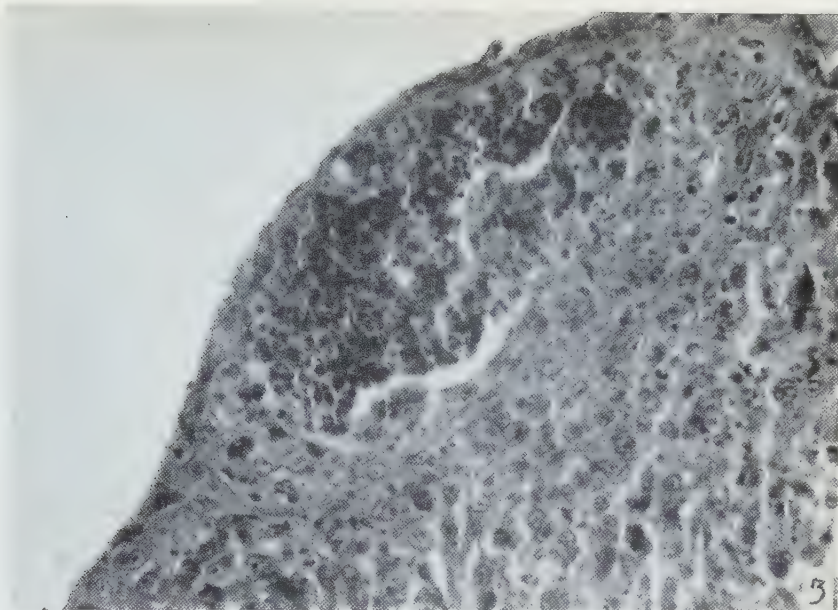


PLANCHE III

FIG. 5. — Même préparation, $\times 250$, mettant en évidence la similitude entre bourgeons ectoblastiques et globes cornés des épithéliomas spino-cellulaires.

FIG. 6. — Préparation 4332 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. La partie profonde du mésoblaste est largement peuplée d'éléments histio-leucocytaires. On y retrouve des globes ectoblastiques nombreux qui viennent presque au contact d'un entoblaste pluristratifié.

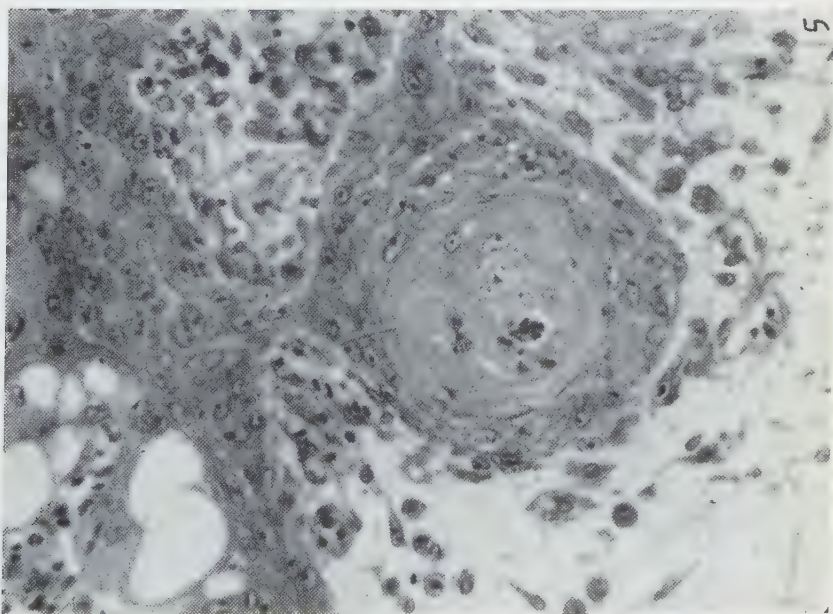
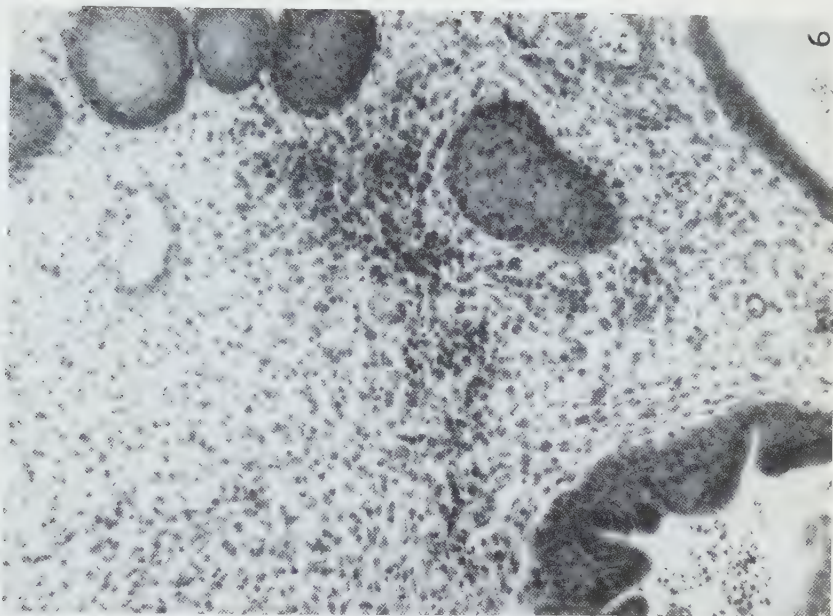


PLANCHE III.

PLANCHE IV

FIG. 7. — Préparation 38450 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement du virus). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. Prolifération ectoblastique avec dégénérescence ballonnisante en surface, bourgeonnement ectoblastique en profondeur, ordonné en arc de cercle. Réaction histiocytaire et fibroblastique du mésoblaste.

FIG. 8. — Préparation 4362 B. M. C. A. inoculée d'un produit variolique (isolement). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 55$. Vive prolifération ectoblastique avec dégénérescence ballonnisante en surface. Réaction histiocytaire du mésoblaste avec néoformation capillaire ordonnée en une ligne continue sous-ectoblastique. Prolifération vilieuse de lentoblaste. Cette même préparation comportait des pustules typiques.

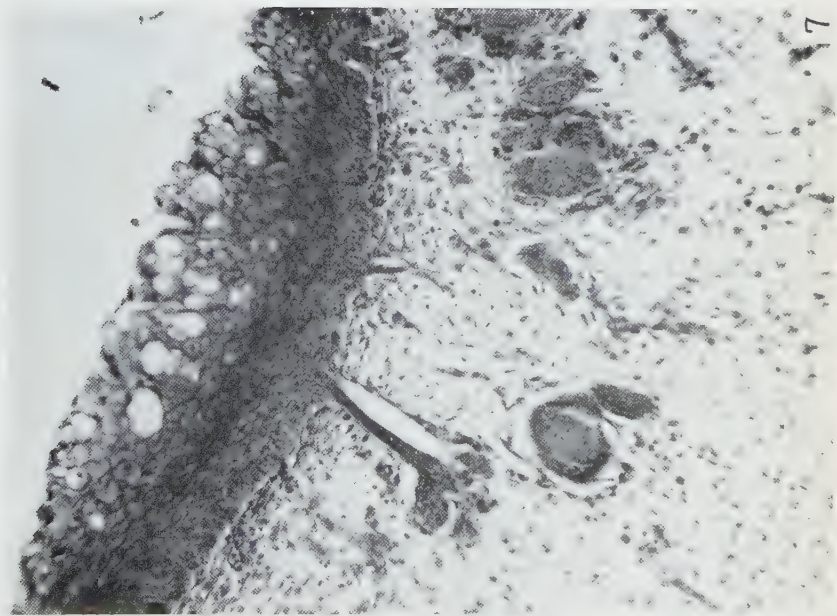
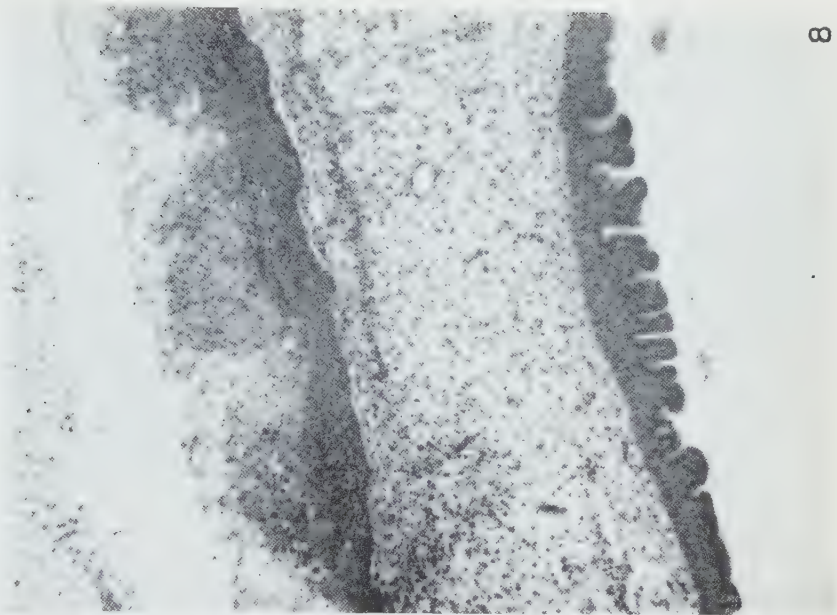
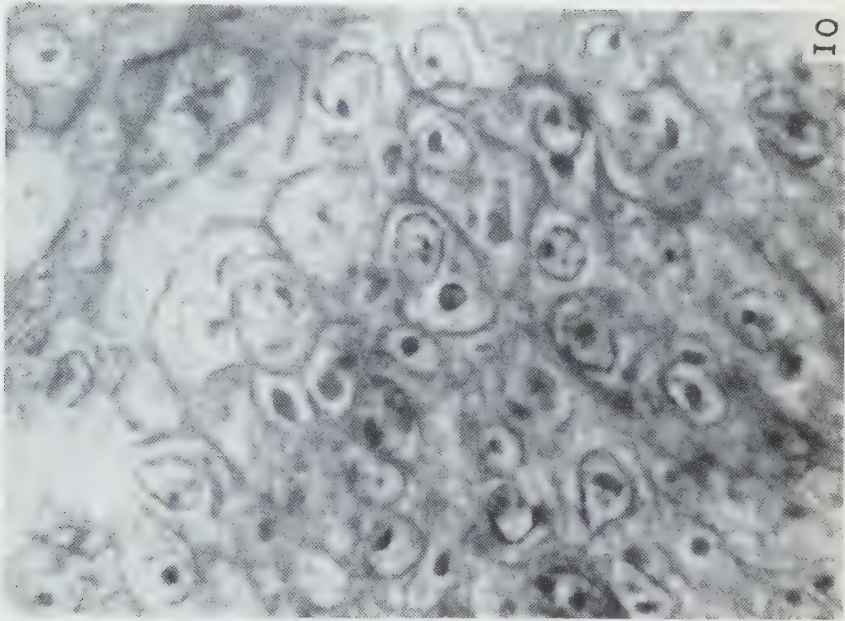


PLANCHE IV.

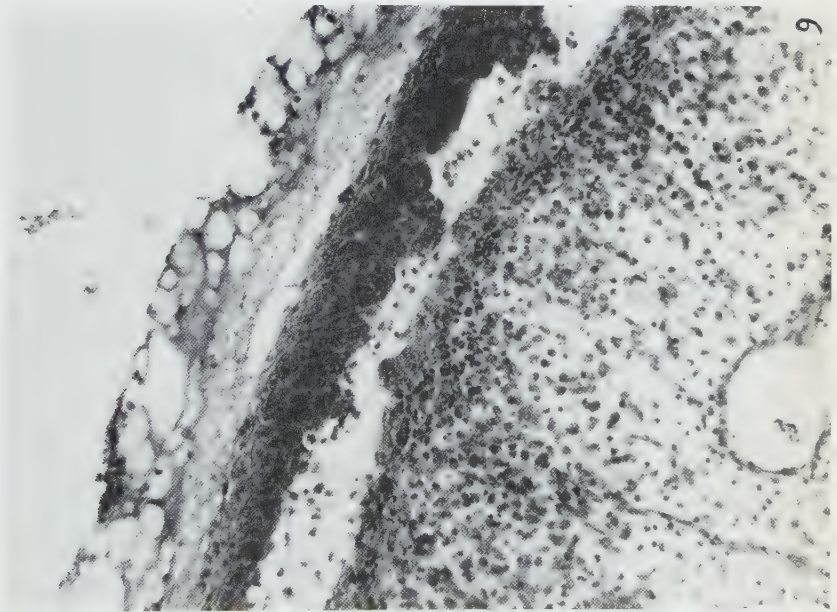
PLANCHE V

FIG. 9. — Préparation 4227 B, M. C. A. inoculée de vaccine (vaccin sec Pourquoi). Prélèvement à la soixante-douzième heure. Fixation Bouin-Hollande. Coloration hémalum-éosine. $\times 100$. L'ectoblaste est en train de se détacher du mésoblaste. Ce dernier témoigne d'un état réactionnel très vif, avec multiplication des éléments histiocytaires et extravasation des leucocytes. Comparer cette microphotographie à la figure 8.

FIG. 10. — Préparation 4227 B. Même préparation vue au niveau d'une pustule. Fixation Bouin-Hollande. Coloration Mann. A l'immersion on note la présence de nombreuses inclusions oxyphiles à type corps de Guarnieri.



10



9

PLANCHE V.



rente et on peut ainsi voir, à distance de cette zone un véritable arc de cercle de globes ectoblastiques.

L'aspect soit cordonnal, soit nettement sphérique de ces proliférations épithéliales, permet de les différencier aisément des bourgeonnements vasculaires. En cas de doute, leur cytologie est de plus très caractéristique : tandis que les cellules endothéliales même réactionnelles ont un noyau à chromatine poussiéreuse, les cellules ectoblastiques ont un noyau pourvu d'un volumineux nucléole, entouré de quelques rares grains chromatiniens de petite taille.

Ces images ont été retrouvées sur la moitié environ des M. C. A. (25 sur 54) et comme ces membranes n'ont pas été étudiées en coupe sériée, il est à présumer qu'en fait leur fréquence est plus élevée. Leur existence ou leur absence ne dépend pas du produit d'inoculation et on les retrouve aussi bien sur des M. C. A. de primo-inoculation que sur des membranes de passage de souche virale.

C. *L'entoblaste*. — Réduit en temps normal à une assise de cellules cubiques ou prismatiques, il va de manière constante participer aux réactions de la M. C. A.

En regard des pustules et de la zone mésoblastique réactionnelle sous-jacente, l'entoblaste devient activement cinétique, multiplie ses strates qui se chiffrent alors par 5 à 10, exceptionnellement plus. Les cellules les plus superficielles prennent alors un aspect prismatique haut. Au niveau de la zone d'hypertrophie entoblastique, la prolifération cellulaire est inégale et donne au feuillet un aspect frangé. L'exocytose, toujours moins vive que celle relevée dans l'ectoblaste, est loin d'être une rareté.

II. — DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL VARIOLE-VARICELLE.

DIAGNOSTIC MACROSCOPIQUE. — En opérant dans les mêmes conditions que celles ci-dessus décrites, mais avec le contenu des éléments vésiculeux de sujets varicelleux, *on n'observe pas de pustules sur les membranes chorio-allantoïques*, même sur celles inoculées avec un produit non dilué. Cependant, on arrive parfois à distinguer un fin pointillé opaque et sans relief, plus facilement observable à la loupe, mais qui ne saurait être confondu avec les lésions varioliques.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE. — Classiquement, le virus varicelleux ne provoque pas de lésions des M. C. A. [5].

L'étude de 23 membranes de primo-inoculation de 8 souches d'un tel virus ne nous autorise pas à accepter ce point de vue.

En fait, si macroscopiquement il n'y a aucune confusion possible entre M. C. A. inoculées de variole et M. C. A. inoculées de varicelle, microscopiquement ces dernières s'avèrent présenter fréquemment des lésions que l'on hésite à rapporter de prime abord au virus varicelleux lui-même. En effet, elles sont inconstantes et ne dépassent guère en intensité ce que peut déclencher comme perturbations histologiques une agression non virale de la M. C. A. (prolifération ectoblastique avec ou sans ballonnisation et nécrose, bourgeonnement possible de l'ectoblaste dans le mésenchyme sous-jacent, réactions vasculaire et mésenchymateuse).

Cependant, du fait de leur fréquence (17 M. C. A. pathologiques sur 24 examinées), de leur observation sur des membranes de primo-inoculation et également de passage, enfin et surtout en raison de leur tendance générale inflammatoire avec intervention d'un infiltrat polynucléé, il semble que l'on puisse raisonnablement assigner une étiologie virale à ces lésions.

En tout état de cause, ces lésions restent toujours d'une intensité bien moindre que celles produites par le virus variolique et ne peuvent être confondues avec elles.

III. — DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL VARIOLE-VACCINE.

DIAGNOSTIC MACROSCOPIQUE. — Les pustules observées sur membrane chorio-allantoïde avec le virus vaccinal sont plus larges que celles du virus varioleux. Elles ne présentent pas un centre acuminé, serti d'une auréole, aussi net que sur les pustules varioliques. Mais cette distinction est un peu une affaire d'appréciation personnelle. Le nombre des pustules obtenues n'est pas significatif non plus, puisque dépendant des dilutions inoculées. Le diagnostic différentiel doit donc être appuyé sur d'autres éléments plus objectifs.

L'épreuve de neutralisation [6] réalisée en injectant parallèlement dans le derme d'un lapin deux séries de dilutions du virus à étudier, l'une en présence de sérum de lapin normal, l'autre en présence de sérum de lapin immunisé contre la vaccine, nous a paru assez délicate à réaliser et à interpréter. En effet, si le derme du lapin réagit fortement avec la vaccine, il n'en va pas de même avec la variole. Nous avons vérifié la sensibilité du lapin à l'inoculation intradermique de 0,10 ml d'une suspension (1 membrane pour 1 ml d'excipient) de membranes chorio-allantoïdes broyées et centrifugées, recueillies lors de l'isolement des souches de variole. Les résultats ont été les suivants :

Intradermo-réaction inférieure à 3 mm	1 souche
Intradermo-réaction de 3 à 6 mm	15 souches
Intradermo-réaction supérieure à 6 mm	3 souches

La totalité de ces souches détermine donc une réaction du derme avec un inoculum concentré ; celle-ci en général, débute quarante-huit heures après l'inoculation, est maximum le troisième jour, et commence à s'estomper le cinquième jour pour disparaître le neuvième jour. Mais cette réaction obtenue par voie intradermique avec des souches récemment isolées est toujours de faible intensité, à peine perceptible à la dilution 10^{-1} et nulle dès la dilution 10^{-2} , ce qui rend l'épreuve de neutralisation difficile à interpréter.

Nous préférons à l'épreuve de neutralisation *l'inoculation de la suspension de membrane sur la cornée et sur l'épiderme scarifiés ainsi que dans le testicule d'un lapin*. Si le virus à vérifier est celui de la vaccine, une réaction intense est observée en trois jours aux lieux d'inoculation : kératite, pustulisation et œdème cutanés, orchite. Elle correspond à la sensibilité classiquement très vive du lapin pour ce virus. Si le virus à vérifier est celui de la variole, on note l'absence de kératite, la discrétion ou l'absence de la réaction épidermique sur les traits de scarification et l'absence d'orchite. L'interprétation est ici plus facile que celle de l'épreuve de neutralisation.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE. — Les lésions histologiques de variole et de vaccine sont très superposables ; le diagnostic différentiel peut être cependant établi grâce à la notion bien classique de la présence de nombreux corps de Guarnieri dans la vaccine et de rareté de ces mêmes éléments dans la variole.

IV —. DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL AVEC LES LÉSIONS NON SPÉCIFIQUES.

DIAGNOSTIC MACROSCOPIQUE. — Les causes des lésions non spécifiques susceptibles de prêter à confusion avec l'aspect macroscopique des lésions varioliques sont au fond peu nombreuses et se limitent principalement aux traumatismes mécaniques de la M. C. A. lors du décollement ou de l'inoculation. On observe alors une image d'ulcère traumatique, plus ou moins étendu, à bords découpés, en relief, en forme de cratère. En diluant l'inoculum, comme il a été indiqué, on évite la confluence des lésions varioliques dont l'aspect serait alors identique à celui d'un ulcère étendu.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE. — Les lésions de variole et de varicelle ne sont guère dissemblables dans leur essence de celles produites artificiellement par des traumatismes, des agents physiques ou chimiques, tout au moins en ce qui concerne les feuilletts ectoblastique et entoblastique. Épaississement, ballonnisation, nécrose,

prolifération intramésenchymateuse de l'ectoblaste et même corps d'inclusion, épaississement de l'entoblaste, ont été retrouvés à de multiples reprises au cours d'une expérimentation ailleurs rapportée [8]. Par contre, le mésoblaste témoignera en présence du virus variolique et, à bien moindre titre, du virus varicelleux, de réactions plus purement inflammatoires que sous l'effet d'agressions non virales. Si dans les deux éventualités, on retrouve œdème, suffusions hémorragiques, altérations vasculaires, prolifération fibroblastique souvent orientée, jamais à notre connaissance agents physiques ou chimiques ne déclencheront un afflux histiocytaire et surtout polynucléé aussi massif que celui observé dans la variole. Aussi, en définitive et sur le plan microscopique, sera-ce le jumelage :

lésions classiquement décrites de l'ectoblaste,
réactions mésoblastiques inflammatoires avec *très large infiltrat polynucléé* (ceci surtout pour la variole),
qui permettra de différencier lésions virales de lésions non virales.

Il est évident que l'on pourra reprocher à ces images un manque de spécificité réelle, mais il faut songer que la M. C. A., représente un tissu embryonnaire dont les réponses affectent obligatoirement une certaine monotonie.

DISCUSSION

La recherche du virus variolique par l'inoculation de la M. C. A. d'embryon de poulet possède l'avantage de la rapidité en permettant un diagnostic de certitude en trois jours. Un autre avantage de cette méthode est sa fidélité.

Les 22 cas de variole ainsi examinés [7] se répartissent en 15 varioles cliniquement certaines et 7 varioles cliniquement douteuses. Sont appelées « douteuses » les varioles pour lesquelles l'éruption discrète, ou d'allure varicelliforme, et la symptomatologie générale mineure auraient égaré le diagnostic d'un clinicien non averti. Dans ces 22 cas, l'inoculation des prélèvements des vésico-pustules a permis d'obtenir, dès le premier passage sur l'œuf, des lésions sur les M. C. A. dont l'aspect macroscopique était très significatif.

Il n'est pas dans notre propos d'entrer ici dans la discussion variole et alastrim. Les 22 cas étudiés se situent dans un épisode endémo-épidémique étalé sur six mois et ayant groupé un total de 39 cas avec 10 décès (6 adultes et 4 enfants, dont aucun antérieurement vacciné). Une grande variété de formes cliniques, bénignes ou gravissimes, s'y trouvent représentées. La faible mortalité globale autoriserait, pour certains, à étiqueter alastrim cette petite épidémie, mais il semble difficile de ne pas porter le

diagnostic de variole pour les éruptions mortelles, confluentes ou hémorragiques, qui ont été rencontrées.

D'ailleurs, en régions tropicales, la mortalité est en partie fonction de la précocité et de l'efficacité de la thérapeutique anti-infectieuse instituée. Les travaux de Dinger [2] et Helbert [3] permettraient de classer comme alastrim les souches qui se révèlent difficilement adaptables ou peu pathogènes sur l'embryon de poulet. Nous nous proposons de vérifier dans un prochain travail s'il y a corrélation entre la gravité clinique des cas et le pouvoir pathogène des souches isolées.

Parmi les 8 cas de varicelle étudiés, 6 provenaient de milieux africains, soit chez des adultes, soit chez des enfants, au moment où l'endémie varicelleuse et l'endémie variolique coïncidaient. Pour deux de ceux-ci d'ailleurs, le diagnostic clinique était partagé entre varicelle et varioloïde, mais l'inoculation sur la M. C. A. a permis d'éliminer la variole. Afin d'éviter la possibilité d'une confusion, l'étude histologique des M. C. A. se réfère plus particulièrement à deux cas de varicelle cliniquement certains, suivis en milieu européen chez des enfants vaccinés contre la variole, dont l'entourage n'a pas été systématiquement revacciné, l'absence de cas secondaires apportant une preuve épidémiologique supplémentaire contre la variole.

RÉSUMÉ

La méthode de diagnostic de la variole par l'inoculation sur la membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet présente, sur l'inoculation à la cornée du lapin (épreuve de Paul), ou au testicule de singe, les avantages d'être simple, rapide et sûre. Il est nécessaire d'observer quelques précautions quant à la dilution de l'inoculum, l'addition d'antibiotiques et la conservation du prélèvement.

Le diagnostic positif se fera macroscopiquement sur la présence d'un semis de pustules ; microscopiquement, il ne sera pas tellement le fait des lésions de prolifération et de nécrose ectoblastique, classiquement décrites, que de l'association de ces lésions avec des réactions mésenchymateuses très importantes et comportant obligatoirement un large afflux de polynucléaires éosinophiles. Le diagnostic différentiel avec la varicelle restera toujours aisé du fait de la contingence et de la discrétion des lésions que l'on peut vraisemblablement rapporter à ce virus ; avec la vaccine, on devra étayer un diagnostic présomptif par l'inoculation au lapin : cornée, peau et testicule. Il ne faut jamais perdre de vue que des facteurs non viraux sont susceptibles de donner des images histologiques très proches des lésions de variole.

SUMMARY

LABORATORY DIAGNOSTIC OF VARIOLA.

II. — INOCULATION INTO CHICK EMBRYO CHORIO-ALLANTOIC MEMBRANE.

This technique possesses several advantages over other methods (inoculation into rabbit cornea or into monkey testis) : it is simple, rapid and accurate. Special care must be taken as to the dilution of inoculum, addition of antibiotics and preservation of the material.

Macroscopically the presence of poxes allows the diagnostic. Histologically, the presence of the conventional, proliferative and necrotic lesions is less important than their association with extended mesenchymatous reactions, implying the presence of a great number of eosinophilic polymorphs.

The differential diagnostic with chicken pox is easy, chicken pox virus only inducing rare and discrete lesions.

The differential diagnostic with vaccinia must be made by inoculation into rabbits (cornea, skin, testis).

One must always keep in mind that non viral factors may yield histological pictures very similar to the lesions due to variola virus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DARRASSE (H.), BRÈS (P.) et CAMAIN (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 576.
 - [2] DINGER (J. E.). *Acta Leidensia*, 1957, **26-27**, 74.
 - [3] HELBERT (D.). *Lancet*, 1957, **272**, 1012.
 - [4] MAC CALLUM (F. O.) et Mc DONALD (J. R.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1957, **16**, 441.
 - [5] BEVERIDGE (W. B.) et BURNET (F. M.). *La culture des virus et des rickettsies dans l'embryon de poulet*. Trad. G. Cateigne. Coll. Institut Pasteur, Flammarion, édit., Paris, 1951.
 - [6] LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). *Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*. Masson, édit., Paris, 1954.
 - [7] BRÈS (P.), VAILLANT (A.), DARRASSE (H.) et LEPROUX (P.). *Bull. Méd. A. O. F.*, 1958, **4**, 459.
 - [8] CAMAIN (R.), BRÈS (P.) et PLAGNOL (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 846.
-

SÉRONEUTRALISATION DES VIRUS POLIOMYÉLITIQUES

par G.-L. DAGUET (*).

(Laboratoire Central de Sérologie,
Hôpital Saint-Louis, Paris)

Depuis décembre 1958, nous appliquons la séroneutralisation des virus poliomyélitiques à la recherche d'informations sur l'immunisation spontanée et provoquée chez de nombreux sujets et, d'autre part, au diagnostic étiologique de syndromes neurologiques évoquant la poliomyélite antérieure aiguë.

Dans ce but, nous avons examiné, en 1959, 3 000 sérums provenant pour les neuf dixièmes de consultants des Centres de Vaccination de l'Assistance Publique et pour un dixième de malades hospitalisés en divers services parisiens.

MÉTHODE

La technique utilisée est celle décrite par P. Lépine, F. et A. Roger sous le nom de : Réaction Cinétique de Séroneutralisation des Virus Poliomyélitiques (*Bull. Org. mond. Santé*, 1959, **20**, 563).

Nous avons reproduit cette technique dans 80 protocoles avec les souches Mahoney pour le type I, MEF1 pour le type II et Saukett pour le type III.

La réaction qualitative a été effectuée de façon routinière sur tous les sérums reçus pour contrôle immunitaire avant et après vaccination : une dose unique de sérum (dilué à 1 : 10 par le virus) a été éprouvée vis-à-vis d'une dose de virus définie comme nécessaire et suffisante pour lyser à 100 p. 100 le système cellulaire KB en test, après trois jours d'incubation à 37°.

L'observation microscopique au troisième jour (microscope à plançon de Zeiss, objectif 6,3, oculaires 8 ×) de l'effet cytopathogène a fourni le résultat de la réaction. Ce résultat a été confronté avec l'observation de l'effet pH au sixième ou septième jour selon les protocoles.

La réaction quantitative a été exécutée dans les mêmes conditions, sur une série de 10 dilutions de chaque sérum. Le titre du sérum est défini par l'inverse de la plus haute dilution neutralisant totalement le virus. Cinq cents sérums ont été ainsi titrés à des fins diagnostiques et pour mesure de l'immunisation.

Ce travail a été poursuivi de façon routinière ; un seul protocole

(*) Manuscrit reçu le 10 février 1960.

(sur 80) a été perdu du fait de facteurs toxiques tenant à un rinçage insuffisant d'un lot de verrerie.

Le milieu à l'hydrolysate de caséine et le sérum de veau ont été stérilisés par passage sur filtre Seitz muni d'un disque EKS. Chaque lot de sérum de veau a été contrôlé avant son emploi routinier et n'a été retenu que s'il était exempt d'anticorps anti-polio, de facteurs toxiques, et assurait une bonne pousse cellulaire.

RÉSULTATS

I. — IMMUNISATION SPONTANÉE.

a) Le tableau I représente la répartition des anticorps observés à l'examen de 2 060 sérums d'enfants ou d'adultes jeunes vivant à Paris.

TABLEAU I. — Immunisation spontanée.

ANTICORPS	:Nombre : de :Sérums	: Pour- :centage	: Age : Moyen
Triple Négatif	: 227	: 11	: 6 ans
Triple Positif	: 657	: 31,6	: 18 ans
Positif 2 Types	: 680	: 32,5	:
Positif 1 Type	: 496	: 24,1	:
TOTAL	: 2060	:	:

Nous retiendrons la confirmation de deux constantes relevées dans diverses statistiques, dont celles de MM. Lépine et R. Martin, à savoir : 11 p. 100 de sujets totalement dépourvus d'anticorps (âge moyen, 6 ans) et 31,6 p. 100 de sujets totalement protégés (âge moyen, 18 ans). La corrélation entre l'âge des sujets étudiés et le niveau d'immunisation étant amplement démontrée, nous citerons seulement, à titre d'exemple, les informations récoltées chez cinq enfants d'une même famille (tableau II).

b) Le tableau III représente la distribution des anticorps élaborés vis-à-vis de chacun des trois types de virus considérés. La fréquence des infections inapparentes dues à chacun des trois virus est pratiquement équivalente.

c) D'autre part, l'étude quantitative des anticorps chez les non-vaccinés a porté sur 48 sérums. Les taux les plus divers ont été obtenus, de 10 à 10 240, avec des moyennes de l'ordre de 80 chez le petit enfant et de 320 chez l'adulte jeune.

TABLEAU II. — Immunisation spontanée de cinq enfants d'une même famille.

AGE	Type I	Type II	Type III
6 ans	N	N	N
9 ans	N	N	P
11 ans	P	N	P
12 ans	P	N	P
18 ans	P	P	P

Huit sérums titrés proviennent d'infirmières, non vaccinées, âgées de 18 à 38 ans et travaillant dans un service hospitalier de traitement de la poliomyélite. Ces sérums se répartissent en :

Quatre triples positifs (titres de 10 à 320) ;

Trois positifs à deux types (titres de 40 à 640) ;

Un positif à un type (titre 160 en type I).

TABLEAU III. — Immunisation spontanée. Répartition des anticorps (2 060 sérums).

Anticorps	Nombre de Sérums	Pourcentage
Type I	1280	62
Type II	1281	62
Type III	1266	61

Ces données sur l'état immunitaire vis-à-vis de la poliomyélite sont importantes à deux points de vue : elles démontrent la vulnérabilité d'une large part de la population ; elles éclairent l'interprétation des titrages effectués à des fins diagnostiques.

II. — IMMUNISATION APRÈS VACCINATION.

Les anticorps neutralisants ont été recherchés dans les sérums de 650 vaccinés.

a) *Contrôle sérologique après trois injections de vaccin* (tableau IV). — Cinq cent soixante-douze sérums (dont 85 titrés quan-

titativement) proviennent de sujets ayant reçu trois injections de vaccin dans des délais variant de un à six mois. Le contrôle sérologique a été effectué d'un mois à un an après la troisième injection. De larges variations dans la durée d'administration du vaccin (un à six mois) ont-elles eu de sérieuses répercussions sur le développement de l'immunité ? Cela n'est pas évident au dépouillement de nos fiches. Nous ne pouvons d'ailleurs que regrouper dans le tableau IV les résultats globaux dont la confrontation avec le

TABLEAU IV. — Immunisation après 3 injections de vaccin.

	Nombre de Sérums	Pour- centage
Triples Positifs	370	65
Triples Négatifs	20	3,3
Positifs à 2 Types	129	22,5
Positifs à 1 Type	53	9,2
TOTAL	572	

tableau I permet une première appréciation du pouvoir antigénique du vaccin. Comme cela a déjà été bien observé ailleurs, 35 p. 100 des sujets vaccinés ne sont pas totalement protégés après trois injections.

La répartition des anticorps chez les sujets protégés contre deux ou un seul virus est indiquée dans les tableaux V et VI. Il ressort

TABLEAU V. — Répartition des anticorps chez les sujets protégés contre un seul virus.

	Type I	Type II	Type III
Nombre de Sérums	27	7	19
Pourcentage	51	13	36

seulement de ces observations que la protection contre le type I est plus régulièrement assurée que contre les types II et III.

Les examens quantitatifs ont montré que les titres en anticorps

TABLEAU VI. — Répartition des anticorps chez les sujets protégés contre deux virus.

	: Type : I	: Type : II	: Type : III
Nombre de Sérums	: 114	: 77	: 67
Pourcentage	: 88	: 59,5	: 51,5

s'échelonnaient sur un large éventail, de 10 à 10 240, après trois injections de vaccin.

L'apparition des anticorps est plus ou moins rapide selon les individus ; le titre est particulièrement élevé lorsqu'il existe une immunité antérieure à la vaccination.

Les réponses à la vaccination sont souvent identiques pour les membres d'une même famille.

b) *Contrôle sérologique après injection de rappel* (tableau VII).

— Soixante-dix-huit sérums, dont 27 titrés quantitativement, proviennent de sujets ayant reçu une injection de rappel de six mois à un an après la troisième injection.

Le contrôle sérologique a été effectué de trois mois à un an après le rappel.

Aucun sérum n'est totalement dépourvu d'anticorps après le rappel et 90 p. 100 témoignent d'une protection complète.

La protection est totale contre le type I. Sur les trois sérums protégés seulement contre le type I, deux étaient triplement négatifs avant rappel. D'autre part, quatre sérums qui étaient triplement négatifs avant rappel sont devenus triplement positifs quatre mois après.

TABLEAU VII. — Immunisation après rappel (78 sérums).

	: Triples : Positifs	: Positifs : à : 2 Types	: Positifs : à : 1 Type
Nombre de Sérums	: 70	: 5	: 3
Pourcentage	: 90	: 6,5	: 3,5

Le titrage des anticorps effectué sur 27 sérums a fait apparaître des taux variés s'échelonnant encore de 10 à 10 240, taux d'autant plus élevés que le titre, avant rappel, était lui-même élevé. Un

accroissement du titre dans un rapport de 1 à 10 a été fréquemment constaté. Les titres les plus élevés ont été rencontrés aussi bien trois mois que un an après le rappel. La similitude de comportement de sujets appartenant à une même famille a été encore observée.

Nous extrayons de cette série deux cas particuliers :

1° Un enfant de 9 ans, triplement négatif avant rappel, a présenté les titres suivants quatre mois après le rappel :

Type I : 640

Type II : 640

Type III : 80

2° Un agent de notre laboratoire a absorbé accidentellement une dose massive de virus III souche Saukett. Cette jeune femme de 27 ans (M. C. J.) a été vaccinée les 6 novembre 1958, 4 décembre 1958 et 6 janvier 1959. Aucun contrôle sérologique n'avait été effectué avant vaccination. Le tableau VIII représente l'évolution

TABLEAU VIII. - Evolution des anticorps chez une vaccinée après rappel et ingestion buccale de virus III.

DATE	Type I	Type II	Type III
6. 1. 59 avant 3ème injection de vaccin	1280	1280	N
28. 1. 59	1280	1280	10
3. 7. 59 avant injection de rappel	1280	1280	N
7.11. 59	2560	2560	80
21.11. 59 Absorption buccale de Virus Injection de 2 ml. de Vaccin			
25.11. 59	640	640	40
17.12. 59	2560	2560	160

des anticorps avant et après rappel et après absorption par voie buccale de 0,50 ml environ de virus III (titre $10^{-5,4}$) dilué à 1 : 40.

Cette jeune femme n'a présenté aucun trouble à la suite de cet accident et a poursuivi normalement son activité.

III. — LA SÉRONEUTRALISATION APPLIQUÉE AU DIAGNOSTIC DE LA POLIOMYÉLITE ANTÉRIEURE AIGÜE.

Un bilan complet des résultats des titrages exécutés sur 304 sérums n'a pu être dressé faute de certaines informations cliniques, comme des résultats d'examens de sang et de selles effectués en temps opportun.

Nous ne retiendrons qu'un petit nombre d'informations solidement établies, utiles à l'interprétation des résultats de la séro-neutralisation.

Sur 304 sérums titrés, 138 sont des échantillons uniques, prélevés au cours de syndromes variés, surtout méningés. Cent soixante-six sérums appartiennent à 88 paires (récoltées à huit à quinze jours d'intervalle). Selon la clinique, le diagnostic de poliomyélite est probable dans une centaine de cas. Il est prouvé, avec isolement du virus, pour 15 sujets seulement.

De l'analyse prudente de ces données disparates, nous retiendrons les points suivants :

a) La cinétique des anticorps neutralisants élaborés au cours de la poliomyélite, et détectés par la méthode de l'Institut Pasteur, est relativement rapide. En particulier, l'apparition des anticorps neutralisants est précoce, ce qui confère à ce test une grande valeur diagnostique. Dans les cas les plus purs, chez le très jeune enfant, au cours de poliomyélites authentifiées cliniquement et par isolement d'un virus correspondant au seul anticorps présent, nous avons observé la présence d'anticorps neutralisants dès le cinquième jour de la maladie. Cette information, qui nous incite à demander à nos correspondants un premier prélèvement sanguin aussi précoce que possible, est d'une grande importance pour l'interprétation des résultats.

Cette remarquable rapidité d'apparition de l'anticorps neutralisant est aussi évidente chez l'enfant que chez l'adulte. Cependant le titre en anticorps de l'enfant de 6 mois est fréquemment inférieur de dix fois à celui de l'adulte. Si les titres les plus élevés sont observés chez le grand enfant ou chez l'adulte, aussi bien après vaccination qu'au cours de la poliomyélite, aucune relation n'a pu être établie, jusqu'à présent, entre la hauteur du titre en anticorps et la gravité de la maladie.

Une baisse des anticorps a été annoncée chez quelques sujets (contrôlés par trois prélèvements) vers le cinquantième jour de la maladie.

b) Chez un adulte de 19 ans et chez un enfant de 12 ans, suivis

à deux prélèvements, atteints de poliomyélite de gravité différente et porteurs d'anticorps contre les trois types, le virus isolé dans les selles ne correspondait pas à l'anticorps présent au titre le plus élevé (tableau IX).

TABLEAU IX. — Virus isolé : type III. Anticorps à titre élevé : type I.

		ANTICORPS			Virus isolé
		Type I	Type II	Type III	
Ge. H. 19 ans Méningite à liquide clair	1er Pt.				
	5è. jour	1600	10	100	III
	2é. Pt.				
	24è jour (Guérison)	2560	80	160	
Dj. D. 12 ans Paralysies multiples	1er Pt.				
	8è jour	12800	400	400	III
	2é Pt.				
	16è jour	12800	160	160	

Cette apparente contradiction peut s'expliquer si l'on tient compte des données suivantes :

Les trois types de poliovirus peuvent coexister chez un même sujet. L'isolement dans les selles d'un seul virus ne permet pas d'exclure la présence simultanée des autres virus.

Il est bien connu que des sujets cliniquement sains sont porteurs et excrètent des poliovirus. (C'est l'origine même de la dissémination de ces virus aboutissant à l'immunisation spontanée.)

Dès lors, chez le malade, un poliovirus isolé dans les selles n'est pas obligatoirement responsable du processus pathologique en cours.

On admet que la présence d'un anticorps à un titre élevé correspond à la pullulation récente du virus homologue.

L'infestation simultanée par plusieurs poliovirus étant possible, le virus responsable de la maladie n'est pas obligatoirement celui contre lequel l'anticorps se trouve présent au titre le plus élevé.

Ces cas, où les titrages d'anticorps peuvent remettre en cause une étiologie apparemment assurée par l'isolement d'un virus donné, sont d'autant plus fréquents que l'on s'adresse à des sujets plus âgés. Leur interprétation est délicate, en contraste avec la clarté des informations de valeur diagnostique recueillies chez le jeune enfant.

DISCUSSION

1° Une évaluation complète de la spécificité de la réaction cinétique sur cellules KB devrait comporter une comparaison avec les méthodes classiques sur rein de singe. Nous n'avons pu procéder à une telle confrontation. Cependant les résultats de notre étude de l'immunisation spontanée dans la population parisienne corroborent les observations faites antérieurement avec la technique sur rein de singe à l'Institut Pasteur. De plus, de nos propres observations, nous relevons quelques points qui illustrent la spécificité de la réaction cinétique :

a) Le pourcentage, 11 p. 100, et l'âge moyen, 6 ans, des sujets totalement épargnés par les poliovirus ;

b) Le pourcentage, 31,6 p. 100, et l'âge moyen, 18 ans, des sujets totalement immunisés contre les poliovirus ;

c) L'apparition des anticorps, la montée de leur taux, chez les vaccinés, totalement indemnes d'infection à poliovirus avant vaccination (triple négatifs) ;

d) Les cas de deux enfants de 18 mois et 3 ans, atteints de poliomyélite cliniquement certaine, porteurs (à deux prélèvements) d'un seul anticorps homologue au virus isolé dans leurs selles ;

TABLEAU X. — Répartition des anticorps chez 78 sujets malades âgés de 0 à 6 ans.

ANTICORPS	Nombre de Sérums.	Pourcentage
Triples Négatifs	18	23
Triples Positifs	7	9
Positifs à 2 Types	14	18
Positifs à 1 Type	39	50
TOTAL	78	

e) Le pourcentage élevé, 50 p. 100, d'enfants malades de 0 à 6 ans, porteurs d'anticorps dirigés contre un seul type de virus (tableau X).

2° La haute sensibilité de la réaction cinétique apparaît à travers les résultats précédents.

Le seuil de sensibilité de l'examen qualitatif (dilution du sérum à 1 : 10) s'est révélé constant, établissant une frontière très franche, à l'abri des variations techniques normales. La détection d'anticorps à l'état de traces, la hauteur des titres obtenus à l'examen quantitatif par lecture de l'effet cytopathogène au troisième jour traduisent la fine sensibilité de la méthode.

3° La reproductibilité de la réaction cinétique qualitative et quantitative s'est révélée, entre nos mains, comparable à celle observée avec les réactions sérologiques classiques les mieux étalonnées, telles que : réaction de Kline dans la syphilis, titrage de l'antistreptolysine dans le rhumatisme articulaire aigu.

Les discordances partielles observées après des examens qualitatifs répétés sur un même sérum peuvent être évaluées à environ 1 p. 100. Lors des titrages répétés, les variations portent sur une dilution en plus ou en moins, comme avec les réactions classiques. Dans les conditions techniques normales, cet écart est indépendant des caractéristiques des réactifs, cellules, virus employés, dont la constance a été éprouvée dans les témoins de 80 protocoles.

Enfin la bonne reproductibilité de la méthode ressort de la concordance des informations obtenues avec elle dans des laboratoires différents.

CONCLUSION ET RÉSUMÉ

La réaction cinétique de séroneutralisation des virus poliomyéliquiques a été appliquée à l'examen de 3 000 sérums d'enfants ou d'adultes jeunes vivant à Paris.

Avec cette méthode des informations épidémiologiques ont été recueillies, portant sur 2 710 sujets contrôlés avant ou après vaccination.

Ces informations permettent d'apporter de nouveaux éléments au tableau de l'immunisation spontanée d'une population et à l'évaluation de l'efficacité de la vaccination. De larges sondages dans de grandes collectivités, comme la région parisienne, peuvent et doivent être poursuivis par la recherche des anticorps neutralisants. A l'échelon individuel, le contrôle sérologique apporte fréquemment des indications précises sur l'attitude à adopter pour obtenir, avec la plus haute probabilité, l'immunisation complète.

D'autre part, sur le plan du diagnostic de la poliomyélite, la réaction de séroneutralisation, effectuée sur des prélèvements récoltés en temps opportun, s'avère capable de fournir rapidement des données extrêmement précieuses.

La précocité d'apparition de l'anticorps neutralisant a été observée à plusieurs reprises. Chez l'enfant, jusqu'à 6 ans, la réaction est particulièrement intéressante, car elle met très souvent

en évidence un seul anticorps correspondant obligatoirement au virus responsable de la maladie en cours. Plus que la hauteur du titre observé, c'est, chez l'enfant, la présence d'un seul anticorps qui est déterminante pour le diagnostic. Chez l'adulte l'interprétation est plus délicate, mais la valeur du titrage des anticorps neutralisants est comparable à celle de l'isolement des virus.

Enfin la spécificité, la sensibilité et la reproductibilité de la réaction cinétique ont été évaluées et discutées.

SUMMARY

SERONEUTRALIZATION OF POLIOVIRUSES.

The kinetic seroneutralization of polioviruses has been carried out with 3 000 sera of children or young adults living in Paris.

This method yielded epidemiological data on 2 710 individuals studied before or after immunization.

These data allow a better evaluation of the spontaneous immunization of the population and of the efficiency of vaccination. Surveys for the presence of neutralizing antibodies in large communities like that of Paris can and must be carried out. For the individual, a serological test may give accurate information as to the best means to achieve a full immunization.

As to the polio diagnostic, seroneutralization when carried out on serum samples taken at the right time, may rapidly yield important data.

An early appearance of neutralizing antibodies was often noticed. In children under six years, the reaction very often demonstrates only one antibody, corresponding to the responsible virus type. In children, the presence of only one antibody is more important to the diagnostic than the level of the antibody titer. In adults, the interpretation is more difficult, but the value of antibody titration is comparable with that of isolation of the viruses.

The specificity, sensitivity and reproductibility of the kinetic reaction are discussed.

**ISOLEMENT AU TCHAD DE MICROORGANISMES
DU GROUPE DE LA PÉRIPNEUMONIE
APPARTENANT A L'ESPÈCE
*MYCOPLASMA (ASTEROCOCCUS) HOMINIS***

par J.-M. VILLEMOT et A. PROVOST (*)

(Laboratoire de Farcha, Fort-Lamy, Tchad)

Depuis que Dienes et Edsall [1] ont isolé pour la première fois un microorganisme du groupe de la péripneumonie (pleuropneumonia-like organisms = P. P. L. O.) chez l'homme, de nombreuses publications ont traité de ces germes, isolés en particulier du tractus génital humain. Jusqu'ici aucune recherche n'a été faite, à notre connaissance, sur la présence de P. P. L. O. d'origine humaine en Afrique. Fortuitement, au cours de nos travaux sur l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine et sur des P. P. L. O. isolés du tractus génital de vaches zébu, nous avons été amenés à isoler plusieurs souches de P. P. L. O. chez l'homme. Nous étudierons deux de celles-ci en détail. Leurs caractères culturels, biochimiques et sérologiques, ainsi que les circonstances dans lesquelles elles ont été isolées, les rendent particulièrement intéressantes. Nous adopterons dans l'exposé qui suit la taxonomie proposée par Edward et Freundt [2], et reprise par Freundt dans le *Bergey's Manual* (7^e édition).

I. — ISOLEMENT DES SOUCHES.

a) SOUCHE N. — Cette souche a été isolée à Fort-Lamy à partir des selles d'un enfant de 18 mois, qui souffrait d'une entérite avec diarrhée tenace. Aucune médication antibiotique ne fut administrée jusqu'au prélèvement des selles. L'examen parasitaire au microscope à contraste de phase, répété quatre fois à cinq jours d'intervalle, révéla une flore intestinale très perturbée au profit de nombreux protozoaires, parmi lesquels nous avons identifié des kystes d'*Endolimax nana*, de *Blastocystis hominis* et des formes végétatives d'*Entamoeba coli*.

(*) Manuscrit reçu le 15 février 1960.

La présence de microorganismes rappelant la structure des P. P. L. O. nous amena à pratiquer une culture en milieu SS additionné de sérum.

A notre grand étonnement, nous avons obtenu, après quarante-huit heures d'incubation, une culture pure d'un P. P. L. O. à la morphologie mamelonnée caractéristique des colonies de ce groupe. Le repiquage en série dans le milieu B60 Difco, additionné de sérum de cheval, dont nous nous servons dans notre laboratoire, et que Provost et Queval ont décrit ailleurs [3], nous a permis d'affirmer qu'il ne s'agissait pas d'organismes L.

b) SOUCHE NIC. — Cette souche a été isolée de l'urine prélevée stérilement par sondage chez une femme souffrant d'une cystite. Nous avons obtenu une culture pure de P. P. L. O. en bouillon-sérum sans addition de pénicilline.

II. — ETUDE MICROBIOLOGIQUE.

a) SOUCHE N. — A son dixième passage, la souche N nous a servi à l'étude de ses caractères cultureux, biochimiques et biologiques, selon les critères proposés par Edward [4, 5].

Caractères cultureux. La souche N est sérophile obligatoire ; en bouillon-sérum la culture est riche et se manifeste dès la dix-huitième heure dans le milieu que nous utilisons ; le germe cultive dans toute la hauteur du tube, aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose. La culture est opalescente au début, puis un dépôt se forme au bout de quelques jours ; la remise en suspension du culot de germes se fait « en fumée de cigarette » ; la croissance est du type « smooth ».

Caractères biochimiques. Les glucides suivants sont fermentés avec production d'acide : arabinose et saccharose ; ne sont pas touchés : glucose, lactose, lévulose, mannite, galactose, maltose et xylose. Le bleu de méthylène n'est pas réduit, même après sept jours d'incubation.

Pouvoir pathogène pour la souris. Cinq souris ont été inoculées par voie sous-cutanée avec 0,5 ml d'une culture de 36 heures de la souche N. Nous n'avons observé aucune abcédation, ni aucun processus pathologique pendant une période de quinze jours.

Etude sérologique. Nous avons préparé un antigène à partir de la souche N, selon la technique utilisée dans notre laboratoire [3]. Un antisérum a été préparé sur âne de la façon suivante : quatre inoculations par voie intraveineuse à sept jours d'intervalle ont été faites à partir d'une suspension antigénique d'opacité égale à deux fois celle du tube n° 10 de l'échelle de Brown. Sept jours après la dernière inoculation une saignée fut faite à la veine jugulaire de l'âne hyperimmunisé.

TABLEAU I. — Caractères cultureux, biochimiques et biologiques de *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*, souches N et NIC. Comparaison avec les types décrits par Edward et Freundt.

Souches	Besoin en sérum	Croissance	Caractères d'aérobiose	Réduction du B.M.	Action sur les sucres										Pouvoir pathogène souris	
					glucose	lactose	lévulose	mannite	arabinose	galactose	maltose	xylose	amidon	saccharose		
Souches Edward	N	+	smooth	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mul
	NIC	+	granulaire	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	mul
	type 1	+	granulaire	aéro-anaéro.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mul
	type 2	+	granulaire	aéro-anaéro.		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	abcs
	type 3	+	smooth	aéro.		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	abcs
	souche H 106	+	indéf.	aéro.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	non testée
Souches Freundt	groupe 1		granulaire		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	groupe 2		smooth		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	groupe 3		smooth		+++	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+	

Aéro-anaéro. : culture en aérobiose et en anaérobiose.

Aéro-anaéro. : culture en aérobiose et en anaérobiose. Aéro. : culture en aérobiose seule.

Nous avons pratiqué des agglutinations croisées avec les souches de *Mycoplasma* dont nous disposions : souches virulente Maroua et vaccinale T₃ de *Mycoplasma mycoides* variété *mycoides*, agent de la péripneumonie bovine ; souche pathogène Farcha de *Mycoplasma mycoides* variété *capri*, agent de la pleuro-pneumonie contagieuse caprine ; souches III, V, XI, XII, 12, 35 de *Mycoplasma laidlawi* et 76 de *Mycoplasma bovigenitalium*, toutes souches isolées du tractus génital de vaches zébu arabes [6] ; souches N et NIC des *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*. Les antisérums utilisés ont été également préparés sur ânes selon le protocole décrit plus haut ; nous avons décrit en détail par ailleurs la technique d'agglutination lente en tubes [7]. Nous avons fait figurer dans le tableau II les résultats du titrage des agglutinines des divers sérums vis-à-vis des différentes souches.

TABLEAU II. — Agglutinations croisées de sérums anti-*Mycoplasma (Asterococcus)* avec les agglutinogènes de différentes espèces.

Souches	Antisérums								
	M	F	III	XI	XII	35	76	N	NIC
Maroua	640	1	-	-	-	20	1	-	±
T ₃	320	-	±	-	-	10	10	-	-
Farcha	1	40	20	-	1	1	10	-	-
III	2560	20	40	1	160	320	10	20	20
V	2560	10	40	-	160	640	20	20	10
XI	320	1	20	1	160	640	10	-	20
XII	40	40	20	1	1	20	1	10	1
12	2560	10	-	-	160	1280	-	10	10
35	20	20	20	1	160	640	10	10	80
76	-	-	-	-	-	-	80	-	-
N	640	20	20	-	160	320	±	80	10
NIC	1280	1	10	±	80	80	±	20	20

Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution la plus élevée pour laquelle il y avait encore une agglutination.

b) SOUCHE NIC. — *Caractères cultureux*. Sérophilie obligatoire ; culture riche, aéro-anaérobie, du type granulaire.

Caractères biochimiques. Sont fermentés : le glucose, le maltose et l'amidon. Ne sont pas acidifiés : le lactose, le lévulose, la man-

nite, l'arabinose, le galactose, le xylose et le saccharose. Cette souche reste sans action sur le bleu de méthylène.

Pouvoir pathogène pour la souris. Aucun processus pathologique ne suit l'inoculation sous-cutanée à la souris d'une culture riche de la souche NIC, en phase de croissance.

Les caractères des souches N et NIC sont résumés dans le tableau I.

Etude sérologique. Cette étude fut menée parallèlement avec celle de la souche N, et le tableau II collige les résultats obtenus.

DISCUSSION.

Il n'est pas dans notre intention d'épiloguer sur le pouvoir pathogène des P. P. L. O. humains, cette question ayant été très discutée par de nombreux auteurs et étant encore très controversée. Nous n'évoquerons que le typage des souches N et NIC qui rentrent dans le cadre de l'espèce *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*, espèce renfermant les P. P. L. O. isolés du tractus génito-urinaire et du rectum humains.

Afin de faciliter la comparaison des souches N et NIC avec les souches étudiées par Nicol et Edward [8], Edward [5] et par Freundt [9], nous avons reporté dans le tableau I les caractères différentiels de ces souches. Les caractères cultureux, biochimiques et le pouvoir pathogène pour la souris permettent de penser que les souches de *Mycoplasma (Asterococcus) hominis* déjà décrites sont différentes des souches N et NIC.

L'étude sérologique des souches de *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*, et leur comparaison avec d'autres germes du genre *Mycoplasma*, n'ont donné lieu qu'à peu de travaux. Huijsmans-Evers et Ruys [40], par la réaction de fixation du complément, ne mettent en évidence aucune communauté antigénique entre les P. P. L. O. d'origine humaine et *Mycoplasma mycoides* variété *mycoides*. Par contre, Kingsbury [41] utilise pour le diagnostic des urétrites amicrobiennes de l'homme la réaction de fixation du complément avec un antigène préparé à partir d'une souche de péripneumonie bovine. Freundt [9] signale les relations antigéniques croisées totales qu'il a pu observer entre ses souches du groupe III et *Mycoplasma mycoides* variété *mycoides*, alors que les autres groupes se comportent indépendamment. L'étude des relations antigéniques des souches N et NIC au sein du genre *Mycoplasma* montre que celles-ci offrent une architecture antigénique où un agglutinogène au moins est commun avec *Mycoplasma mycoides* variété *mycoides*, *Mycoplasma mycoides* variété *capri* et certaines souches de *Mycoplasma laidlawi*. Par contre, ces souches n'ont aucun agglutinogène commun avec la souche

de *Mycoplasma bovis genitalium* étudiée. Dans d'autres travaux [7] nous avons montré, par la réaction de précipitation en milieu gélifié, et par l'étude du pouvoir bactéricide des antisérums vis-à-vis des différentes souches, que les relations antigéniques pouvaient être très étroites pour des germes d'isolement très différent, et que plusieurs souches possédaient plusieurs agglutinogènes communs. Par l'adsorption des antisérums avec divers agglutinogènes, nous avons été amenés à proposer une classification des P. P. L. O. qui est basée sur leur structure antigénique [42].

RÉSUMÉ.

Les auteurs relatent l'isolement au Tchad de deux souches humaines de *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*.

Par leurs caractères culturels et surtout leurs caractéristiques antigéniques, ces souches semblent se rapprocher plus de souches isolées du tractus génital bovin que des souches humaines déjà décrites.

SUMMARY

ISOLATION IN THE TCHAD REGION OF PLEUROPNEUMONIA-LIKE ORGANISMS BELONGING TO THE SPECIES *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*.

Isolation in the Tchad region of two human strains of *Mycoplasma (Asterococcus) hominis*.

The cultural and antigenic properties of these strains seem to be more closely related to those of the strains isolated from the bovine intestine tract than to those of the human strains previously described.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DIENES (L.) et EDSALL (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1937, **35**, 740.
- [2] EDWARD (D. G.) et FREUNDT (E. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 197.
- [3] PROVOST (A.) et QUEVAL (R.). *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1957, **10**, 357.
- [4] EDWARD (D. G.). *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 311.
- [5] EDWARD (D. G.). *J. gen. Microbiol.*, 1954, **10**, 27.
- [6] VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, **12**, 5.
- [7] VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, **12**, 251.
- [8] NICOL (C. S.) et EDWARD (D. G.). *Brit. J. vener. Dis.*, 1953, **29**, 141.
- [9] FREUNDT (E. A.). *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1954, **34**, 127.
- [10] HUIJSMANS-EVERS (A. G. M.) et RUYS (A. C.). *Antonie v. Leeuwenhoeck*, 1956, **22**, 371.
- [11] KINGSBURY, cité par BOREL (L. J.). *Biol. Med.*, 1952, **41**, 379.
- [12] VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, **12**, 369.

LA MULTIPLICATION DES AGENTS DES TRYPANOSOMIASES HUMAINES AFRICAINES EN CULTURE DE TISSUS

par J. DEMARCHI et J. NICOLI (*).

(Institut Pasteur de Brazzaville)

Il est classique d'affirmer la difficulté de cultiver les agents des trypanosomiasés humaines africaines (T. H. A.) et plus généralement les trypanosomes du groupe *brucei*. Cette difficulté se traduit sur un plan pratique par la multitude des milieux complexes proposés pour l'isolement de ces trypanosomes à partir du sang des malades [9, 10, 1, 15, 13, 8], aussi bien que par l'incertitude de leurs résultats. Elle dépend d'une façon plus générale d'un manque de connaissances précises sur les facteurs de croissance de ces flagellés. Une définition exacte de ces facteurs apparaît pourtant nécessaire aussi bien à une analyse de la physiologie de ces trypanosomes, permettant l'élaboration de milieux complexes ou semi-synthétiques plus adéquats à leur prolifération, qu'au développement de connaissances générales encore mal précisées mais dont on prévoit toute l'importance ultérieure.

Par ailleurs, de nombreuses recherches ont démontré la possibilité de la culture des trypanosomes de ce type en œufs embryonnés [2, 5, 7, 11]. En culture de tissus par différentes techniques, des travaux n'ont été faits, à notre connaissance, que pour *Trypanosoma cruzi*, dont une partie du cycle est endocellulaire [3, 12, 14, 16]. Toutes ces recherches utilisaient, sans l'expliquer pour la plupart, la fourniture par les cellules-hôtes des métabolites indispensables à la croissance des trypanosomes.

Il a paru digne d'intérêt à ce point de vue d'entreprendre l'étude du comportement des agents des trypanosomiasés humaines africaines en culture de tissus, en retrouvant par là même les préoccupations qui ont fait l'objet du début de cet exposé.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° LES SOUCHES DE TRYPANOSOMES ÉTUDIÉES. — Cinq souches ont été étudiées : 1 et 2 : une souche de *T. rhodesiense* et une souche de *T. gambiense* entretenues sur rongeurs de laboratoire par passages mécaniques ; 3 et 4 : deux souches de *T. gambiense* isolées de malades

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mars 1960.

et entretenues sur milieu de Brutsaert-Henrard ou sur milieu actuellement utilisé à l'Institut Pasteur de Brazzaville, dérivé du milieu NNN ; 5 : une souche de *T. gambiense* isolée sur le même milieu du tube digestif de la glossine.

Des tentatives d'isolement ont été faites, par ailleurs, directement à partir de produits pathologiques (sang, suc ganglionnaire, liquide céphalo-rachidien) de sujets humains reconnus infectés.

2° LES CULTURES DE TISSUS. — Deux souches de cellules épithéliales d'origine humaine ont été utilisées, souche HeLa et souche HEP. Elles ont été cultivées en couche monocellulaire en milieu à l'hydrolysate de caséine additionné de 5 p. 100 de sérum de veau (Lépine et coll. [4]). Les suspensions cellulaires à 100 000 cellules par centimètre cube ont été réparties, après trypsinisation d'une boîte d'entretien, en tubes de 12 × 120 (1 ml) ou en tubes à lamelles (2 ml), bouchés au caoutchouc. Le milieu était changé après deux à trois jours, selon l'état de la culture. Les solutions usuelles d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, sans mycostatine) ont assuré la stérilité du milieu et garanti la pureté de la culture des trypanosomes.

Pour l'examen cytologique, les lamelles des tubes ont été colorées à l'hémalum-éosine et montées au baume.

3° L'ENSEMENCEMENT DES TRYPANOSOMES. — Les trypanosomes ont été ensemencés à partir des milieux empiriques d'isolement ou d'entretien, à partir des produits humains ou animaux, après numération à la cellule et dilution si nécessaire, afin d'obtenir pour tous les tubes d'un même protocole un inoculum sensiblement équivalent quant au nombre des trypanosomes. Une méthode identique est utilisée pour les passages ultérieurs en cultures de tissus. Pour éliminer le rôle des substances du milieu de départ apportées lors de l'ensemencement, il a paru plus simple de faire des passages en série, plutôt que d'effectuer des lavages ou des centrifugations sur des organismes relativement fragiles. L'ensemencement est fait rarement au moment même de la répartition de la suspension cellulaire, le plus souvent après le premier changement de milieu.

4° OBSERVATION ET MESURE DE LA CROISSANCE DES TRYPANOSOMES. — L'observation de la croissance et une première appréciation subjective de son évolution ont été faites par l'examen microscopique entre lame et lamelle d'une goutte de milieu de culture prélevée stérilement, ou plus simplement encore et de façon très satisfaisante, par l'examen microscopique à faible grossissement ($\times 90$) à travers la paroi du tube de la couche cellulaire : les trypanosomes, dans ces conditions, se reconnaissent très aisément aux mouvements de leurs flagelles.

Etant donné que la présence des cellules de souche interdit toute mesure de l'activité métabolique des seuls trypanosomes au manomètre de Warburg et que les méthodes densimétriques sont inapplicables, l'étude quantitative de la croissance a été faite par numération des trypanosomes contenus dans une cellule de 1/10 de millimètre cube, sur un échantillon de la culture rendue homogène par agitation. Les

causes d'erreurs sont celles de toute méthode de numération : 1° répartition inégale de trypanosomes au sein du milieu ; 2° erreurs de lecture quand les parasites deviennent trop nombreux ; 3° présence de rosaces parfois volumineuses, particulièrement en fin de croissance.

Une agitation suffisamment prolongée, l'établissement de la moyenne des lectures successives d'un même échantillon y ont remédié en partie.

RÉSULTATS.

Seront successivement étudiés : 1° la possibilité de cultiver les agents des trypanosomiasés humaines africaines en cultures de tissus ; 2° les conditions de culture ; 3° l'étude quantitative de la croissance ; 4° l'action des trypanosomes sur les cellules cultivées ; 5° leurs caractères généraux ; 6° les apports du milieu de culture et les apports des cellules hôtes.

1° LA POSSIBILITÉ DE CULTIVER *T. gambiense* et *T. rhodesiense* EN CULTURE DE TISSUS.

a) Dans les conditions qui sont précisées ci-après, il est aisé de contrôler l'apparition des parasites dans les cultures, la présence de formes de division, binaires ou rosaces, l'augmentation de la densité des parasites par champ microscopique à mesure du développement de la culture, pour toutes les souches étudiées. L'observation est rendue plus difficile et les résultats moins probants quand l'inoculum provient du milieu de Brutsaert-Henrard ou directement du sang pathogène, la multiplication notée se faisant là dans des conditions très différentes en raison de la présence des cellules sanguines.

b) Mais dans tous les cas la multiplication est démontrée par la possibilité d'effectuer des subcultures en série sur cellules, subcultures qui donnent lieu aux mêmes observations, quel que soit le nombre de passages déjà effectués.

Il est possible de revenir à un moment quelconque sur les milieux empiriques habituels.

On a pu ainsi cultiver des trypanosomes, entretenus par passages mécaniques sur rongeurs, contrairement à des idées établies, mais dont Ceccaldi et Lwoff avaient, sur milieux empiriques, déjà montré l'inexactitude [6 b].

c) Les tentatives d'isolement de *Trypanosoma gambiense* à partir de produits du malade (6 cas) ont, par contre, toutes échoué comme d'ailleurs les tentatives parallèles à partir des mêmes produits sur milieux empiriques.

2° LES CONDITIONS DE CULTURE.

a) *Souche de cellules-hôtes.* — Aucune différence n'est notée entre les cultures sur l'une ou l'autre des souches de cellules uti-

lisées, en particulier par la comparaison des courbes de croissance établies.

b) *Moment de l'ensemencement.* — Les T. H. A. se multiplient en cultures de tissus, que l'ensemencement soit fait au moment de la répartition de la suspension cellulaire ou au premier changement de milieu. Dans tous les autres protocoles, dans un but de standardisation, l'ensemencement a été fait de façon uniforme après le premier changement de milieu.

c) *Température.* — La culture se développe entre 23° et 31°, sans différence significative dans l'intervalle de ces deux températures extrêmes. Les souches de cellules utilisées supportent bien ces températures. Aucune culture ne s'est développée à 37°.

d) *pH.* — Les trypanosomes se multiplient bien au pH ajusté pour la culture de tissus entre 7,2 et 7,3.

e) *Date des repiquages.* — Il est avantageux d'effectuer les repiquages approximativement tous les six à sept jours, c'est-à-dire à la fin de la phase exponentielle de croissance. Toutefois ces repiquages peuvent être faits à intervalles notablement plus éloignés, tous les quinze à vingt jours.

f) *Grandeur de l'inoculum.* — Pour les T. H. A. en culture, il a été possible d'obtenir une multiplication à partir d'un inoculum ne contenant que 20 éléments. Les cultures ont toujours réussi dans tous les tubes ensemencés. A partir du sang de l'animal, au contraire, il est nécessaire, pour réussir l'isolement, d'ensemencer un certain nombre de tubes. Comme avec les milieux empiriques, les T. H. A. ne se développeront que dans quelques-uns de ces tubes.

3° ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE.

Les courbes représentant la croissance des trypanosomes (mesurée par le nombre d'éléments parasitaires par millilitre de milieu) en fonction du temps sont des sigmoïdes classiques avec les phases de latence, d'accélération exponentielle, de ralentissement et de maximum stationnaire, enfin de décroissance. Le remplacement de l'échelle arithmétique des ordonnées par une échelle logarithmique de base 2 transforme la partie exponentielle de la courbe en droite, et il est aisé de déterminer graphiquement les paramètres classiques.

Les valeurs de ces paramètres varient entre des limites assez larges. Cela est dû au fait que la croissance est fonction pour une part de l'activité métabolique des cellules qui varie elle-même sous l'influence de facteurs difficiles à standardiser. Le taux de l'aliment

jouant le rôle de facteur limitant, l'accumulation de substances toxiques, le taux d'aération du milieu, qui conditionnent la croissance totale, aussi bien que la concentration des différentes substances nutritives qui influencent le taux de croissance maximum, sont directement dépendants de la croissance des cellules de souches et de leur état d'activité.

a) Le temps de latence oscille entre trente-trois et quarante-huit heures (moyenne des observations : trente-sept heures). Il est mesuré par le retard de la culture sur une culture théorique analogue qui au temps 0 se trouverait déjà en phase exponentielle.

b) La croissance totale. Avec un inoculum standardisé pour avoir une concentration de 30 (± 10) éléments par millilitre de

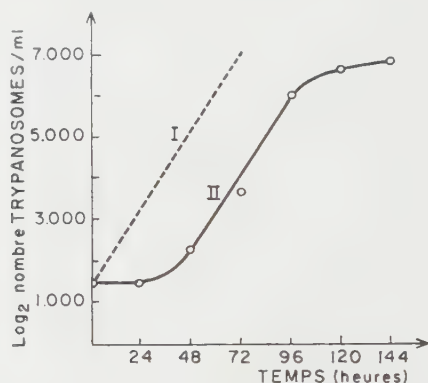


FIG. 1. — Croissance des T. H. A. en culture de tissus. Taux de latence : trente-six heures. Taux de croissance maximum : $\mu = 0,062$. Croissance totale : C : 5,3 U log 2.

milieu, le nombre de T. H. A. par millilitre de milieu à la période de maximum stationnaire oscille entre 800 et 2 000.

Elle peut être exprimée en unités arbitraires (U log 2) selon la formule $CT = \log 2 Dm - \log 2 Dd$.

(Dm étant la densité au maximum stationnaire et Dd la densité au départ).

Elle varie alors entre 5,3 et 8 unités log 2.

c) Le taux de croissance maximum : il est calculé d'après la formule $\mu = n/t$ avec n = nombre de divisions et t = temps (en heures).

Faible, il varie entre 0,055 et 0,101 (moyenne des observations : 0,078).

Il faut donc de dix à dix-huit heures à un trypanosome pour se diviser à la phase exponentielle de croissance.

Etant donné ces éléments et dans les conditions des expériences la phase de maximum stationnaire est atteinte six à huit jours après l'inoculation du tube de culture (fig. 1).

4° ACTION DES TRYPANOSOMES SUR LES CELLULES CULTIVÉES.

Cette action est faible, se bornant à une accélération légère de la desquamation dans les tubesensemencés par rapport aux tubes témoins. L'augmentation du nombre de cellules métabolisant à l'intérieur d'un même volume de milieu, entraînant par là même l'accélération de la consommation des principes nutritifs et des modifications physico-chimiques rendant le milieu impropre à la croissance, suffit à expliquer cette action non spécifique.

5° LES CARACTÈRES DE LA POPULATION TRYPANOSOMIENNE CULTIVÉE.

a) *Caractères morphologiques.* — Les formes observées ne diffèrent pas sensiblement des formes observées parallèlement avec la même souche sur milieu empirique. Ce sont : 1° des formes courtes trapues, pouvant devenir globuleuses, à long flagelle, sans membrane ondulante, à blépharoplaste antérieur ; 2° des formes longues et minces, à blépharoplaste occupant une position variable par rapport au noyau, mais jamais terminal ni subterminal, flagellées ; 3° des formes de division binaire et des rosaces pouvant grouper une centaine d'éléments ou plus.

Les proportions de ces différentes formes varient selon le moment de la culture et selon la souche. Il faut noter, en particulier, la fréquence des formes courtes sur la souche provenant de l'intestin de la glossine.

b) *Caractères physiologiques.* — Il a déjà été signalé que ces formes se développaient bien entre 23° et 31°, mais non à 37°.

c) *Pouvoir pathogène.* — Les trypanosomes obtenus à partir de l'animal de laboratoire (cobaye, rat ou souris) perdent leur pouvoir pathogène pour ces animaux dès le premier passage. Parallèlement, les formes en culture, en particulier celles isolées de l'intestin de glossine, ne récupèrent ni n'acquièrent un pouvoir pathogène.

Toutefois aucune tentative n'a pu être faite par l'intermédiaire de glossines.

6° FACTEURS DE LA CROISSANCE.

a) *Les apports du milieu de culture des cellules de souche.* — Ce milieu est le milieu conventionnel dont la composition précise a été décrite par Lépine et coll. [4]. Il faut souligner qu'il comporte

les éléments suivants, paraissant importants quant à l'objet de cette étude :

La solution saline (solution de Earle) est glucosée à 1 p. 1 000. La caséine apporte tous les acides aminés, à l'exception du groupe cystéine-cystine, et le milieu est supplémenté par apport de cystéine (et même de glutamine). Du point de vue vitaminique est réalisé l'apport d'acide ascorbique, d'un complexe vitaminique du groupe B (notamment de thiamine et de pantothénate de calcium) de biotine et d'acide folique. Avant emploi, des facteurs sériques sont apportés par 5 p. 100 de sérum de veau. Ce milieu comporte, à l'exception de l'hématine, tous les facteurs de croissance déjà connus pour être nécessaires à d'autres membres de la famille des *Trypanosomidae* (travaux d'A. et M. Lwoff qui sont analysés dans la revue de M. Lwoff [6]).

Sur ce milieu ainsi composé et en l'absence de cellules, les T. H. A. ensemencés ne survivent pas ou seulement un temps limité (deux à trois jours). Il se produit parfois, cependant, une multiplication limitée (disparition des parasites après sept à huit jours, densité générale ne dépassant jamais 100 éléments au millilitre) quand l'inoculum provient directement d'un milieu au sang, ce qui suggère l'apport dans l'inoculum de facteurs provenant du milieu empirique d'origine et nécessaires aux T. H. A.

b) *L'apport des cellules.* — L'existence même d'une multiplication des trypanosomes telle qu'elle est observée en culture de tissus suppose donc la synthèse par les cellules et la diffusion dans le milieu de facteurs de croissance nécessaires aux parasites, c'est-à-dire l'existence d'un phénomène de satellitisme dont la physiologie des microorganismes offre par ailleurs maints exemples.

Il est probable que les cellules sont capables de fournir la plupart des facteurs de croissance nécessaires. Si, après la croissance des cellules en effet, le milieu a été remplacé par une solution saline, glucosée ou non (solution de Earle) et des trypanosomes ensemencés, il est possible de constater leur multiplication. La croissance totale est, toutefois, nettement inférieure à celle des tubes témoins de la série où le milieu neuf est un milieu complet. On ne peut cependant espérer, en raison des grandes variations individuelles des courbes de croissance, et de la difficulté de standardiser des facteurs dont une partie tient à l'activité physiologique des cellules, définir certains des éléments nécessaires à la croissance des T. H. A., en supplémentant la solution saline avec différentes substances.

Quoi qu'il en soit, dans le protocole habituel où le milieu de culture des cellules est suffisamment riche pour apporter à priori un certain nombre de facteurs de croissance ou d'épargne, il semble difficile de définir le facteur unique ou les facteurs apportés

par les cellules et qui permettent la croissance des T. H. A. On sait toutefois la nécessité générale de la présence de sang complet, qui peut être d'origine spécifique très variée, dans les milieux empiriques utilisés. Le milieu contenant du sérum, le ou les facteurs apportés par les cellules doivent être analogues à ceux fournis par les globules rouges et plus précisément aux porphyrines, qui forment le groupement prosthétique de l'hémoglobine ; il pourrait s'agir de la protoporphyrine ou de l'hématine qui en est le sel de fer, et qui apparaît comme un constituant constant des cellules animales. On retrouverait ainsi la nécessité de l'hématine pour les T. H. A. comme pour *Trypanosoma cruzi* déjà étudié par M. Lwoff [6 a], et pour d'autres membres de la famille des *Trypanosomidae*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

La culture des agents des trypanosomiasés humaines africaines, comme celle de tout autre microorganisme, demande la résolution de deux séries de problèmes qui ne se recouvrent pas entièrement.

D'évidence, les premiers sont d'ordre physiologique ; ils consistent : 1° à trouver un milieu qui contienne les éléments nécessaires à la croissance des espèces étudiées ; 2° qui conserve aux souches cultivées les caractères phénotypiques qu'elles présentent *in vivo* ; 3° à définir les facteurs de croissance contenus dans un tel milieu. La culture de tissus représente un bon milieu de multiplication. Ce milieu complexe est d'analyse difficile, mais des arguments d'ordre analogique suggèrent qu'une partie de son action est due à la présence d'hématine. La solution du problème n'est cependant que partielle, car malgré l'utilisation de cellules de lignée humaine et l'espoir que l'on en pouvait nourrir de réaliser *in vitro* des conditions voisines de celles de l'hôte, les populations cultivées, comme celles des milieux empiriques jusqu'ici utilisés, diffèrent des populations *in vivo* par l'absence de pouvoir pathogène et un optimum thermique différent. C'est donc que le milieu ne contient pas les éléments nécessaires, soit au maintien de la structure génétique d'une population hétérogène à ces points de vue, soit à l'expression phénotypique de ces caractères. Quelle que soit l'hypothèse finalement retenue, ce problème se ramène à un problème nutritionnel. On sait, par exemple, la nécessité de l'apport d'un facteur de croissance supplémentaire pour permettre la croissance de *Leishmania donovani* à 37°. On sait également le rôle que Weinman veut faire jouer au tréhalose dans la conservation du pouvoir pathogène des T. H. A.

L'isolement des T. H. A. à partir des produits pathologiques constitue le deuxième problème. En culture de tissus l'isolement a été réussi à partir du sang des animaux de laboratoire, mais les expériences limitées qui ont été faites à partir de produits humains

ont toutes été sans succès. Il est cependant vraisemblable qu'un emploi plus étendu d'artifices, comme l'utilisation d'un sérum agglutinant antiglobules rouges humains, permettrait de retrouver des résultats comparables à ceux qui sont enregistrés avec les milieux empiriques habituels. Les difficultés de l'isolement soulignent toutefois que le problème dépasse le seul cadre des facteurs nécessaires à la multiplication des trypanosomes. Deux ordres de faits peuvent être invoqués à priori : 1° Il peut exister dans le produit pathologique des facteurs inhibiteurs dont une partie pourrait être de nature immunologique, et c'est déjà en partie en fonction d'une action adsorbante éventuelle du couple peptone-gélatine sur les anticorps nuisibles aux formes culturales que Ponselle [9] avait décrit son milieu d'isolement. 2° On connaît l'importance des phénomènes qui se passent au cours de la période de latence, et qui vont précisément permettre l'adaptation des microorganismes aux conditions de culture qui leur sont imposées. Cette période est longue pour les T. H. A. en culture de tissus. Il est possible que génétiquement ou par suite de circonstances diverses, les souches que l'on tente d'isoler soient incapables de réaliser les processus adaptatifs nécessaires. C'est donc là encore à une analyse plus fine de la physiologie des parasites qu'il faut tendre pour aboutir à un milieu où leur adaptation puisse être aisément réalisée.

Il apparaît que les problèmes soulevés par les constatations faites lors de la multiplication des T. H. A. en culture de tissus rejoignent les problèmes généraux concernant la nutrition de ces parasites. Ils sont susceptibles d'être résolus par une étude poussée des conditions physiologiques qui président à leur développement.

RÉSUMÉ.

Les auteurs établissent les points suivants :

1° Il est possible de cultiver les agents des trypanosomiasés humaines africaines en culture de cellules épithéliales d'origine humaine. Les courbes de croissance sont caractérisées par la longueur de la période de latence et la lenteur de la division.

2° Cette croissance doit être interprétée dans le cadre classique des phénomènes de satellitisme. Les auteurs suggèrent que les cellules agissent au moins en partie en synthétisant l'hématine nécessaire aux flagellés.

3° Les caractères des populations de trypanosomes obtenues diffèrent de ceux des populations *in vivo*. Ces faits soulignent les inconnues qui restent à éclaircir au point de vue de la nutrition de ces agents pathogènes et indiquent les voies utilisables pour les résoudre.

SUMMARY

MULTIPLICATION OF AFRICAN HUMAN TRYPANOSOMIASIS AGENTS
IN TISSUE CULTURE.

The experiments yielded the following results :

1. It is possible to cultivate these agents on human epithelial cell culture. The growth-curves are characterized by the long duration of the lag period and of the generation time.

2. This multiplication must be interpreted as a classical phenomenon of satellitism. The authors suggest that the action of the cells is due, at least partially, to their ability to synthesize the hematin needed by the Flagellates.

3. The *Trypanosoma* populations obtained in culture differ from the *Trypanosoma* populations *in vivo*, with regard to virulence and ability to multiply at high temperatures. These facts emphasize the gaps in our knowledge of the physiology of these parasites ; they particularly point out fundamental differences existing between the metabolism in culture forms and in the various forms of the natural cycle.

★
★★

Nous prions Monsieur le Dr Ghijssels (I. M. T. P. A., Léopoldville), qui nous a fourni la souche de *T. rodhesiense*, et Monsieur le Dr Depoux, qui nous a procuré la souche H. E. P., de bien vouloir trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRUTSAERT (P.) et HENRARD (C.). *Ann. Soc. Belge Med. trop.*, 1936, **16**, 479 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1469.
- [2] CHABAUD (A.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1939, **32**, 489.
- [3] HAWKING (F.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1946, **40**, 345.
- [4] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
- [5] LONGLEY (B. J.), CLAUSEN (N. M.) et TATUM (A. L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1939, **41**, 365.
- [6] LWOFF (M.). *In Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 1951, **1**, 129 et suiv.
- [6 a] LWOFF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **206**, 540.
- [6 b] LWOFF (M.) et CECCALDI (J.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1939, **32**, 721.
- [7] OAG (R. K.). *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 137.
- [8] PACCHANIAN (A.). *Amer J. trop. Med.*, 1959, **8**, 668.
- [9] PONSELLE (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **178**, 1219.

- [10] REICHENOW (E.). *Z. Parasitenk.*, 1932, 4, 784.
 - [11] RHODAIN (J.) et VAN DEN BERGHE (P.). *Ann. Soc. Belge Med. trop.*, 1943, 23, 141.
 - [12] ROMANA (C.) et MEYER (H.). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 1942, 37, 19.
 - [13] TOBIE (E. J.), VON BRANDT (T.) et MEHLMAN (B.). *J. Parasit.*, 1950, 36, 48.
 - [14] WARREN (L. G.). *Exp. Parasit.*, 1958, 7, 82.
 - [15] WEINMAN (D.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1944, 55, 82.
 - [16] YAEGER (R. G.). *Amer. J. trop. Med.*, 1958, 7, 252.
-

L'ACTIVITÉ AMYLOLYTIQUE DES SOLS

MÉTHODE D'ÉTUDE ET INTERPRÉTATION

par J. AUGIER et R. MOREAU (*).

(Institut Pasteur, Paris
et Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie, Besançon)

Les méthodes dites « en différentielle » permettent de déterminer l'activité microbiologique de la microflore des sols vis-à-vis d'un substrat donné. Nous ne reviendrons pas sur l'intérêt général de ces méthodes, il a été exposé dans un précédent mémoire [1], mais nous montrerons dans le présent travail comment l'on peut appliquer cette méthodologie à la mesure de l'activité amylolytique des sols. La technique est semblable dans son ensemble à celle qui a été longuement décrite dans le cas de l'hémicellulolyse [2, 3, 4].

I. — PRINCIPE DE LA MÉTHODE.

Un milieu électif pour les germes amylolytiques est ensemencé à l'aide de suspensions-dilutions de la terre étudiée. Dans ce milieu l'azote est présent sous forme nitrique et la source énergétique est l'amidon. C'est l'apparition des nitrites qui permet de repérer le début de la culture, dont la fin est marquée par la disparition de l'amidon. Connaissant ces deux phases de la croissance des germes, il est possible de déterminer pour chaque dilution, l'activité de ces derniers. Les résultats sont représentés graphiquement.

II. — ÉTUDE DU MILIEU DE CULTURE.

Nous avons vu que le milieu doit être *électif* : il ne pourra donc contenir aucune source d'énergie autre que l'amidon. Nous avons finalement choisi *l'amidon soluble*, comme dans le milieu proposé par H. de Barjac [5], mais à la concentration de 1 p. 1 000 seulement.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mars 1960.

C'est le *nitrate de potassium* (ou de *sodium*) qui représente la source d'azote. En effet, la plupart des germes amylolytiques produisent des nitrites au début de leur phase exponentielle de croissance, à partir des nitrates du milieu. Le réactif de Griess pour les nitrites étant justement d'une très grande sensibilité, il sera donc possible, en l'employant, de déceler le début de la croissance bactérienne. Il devient donc possible de déterminer chaque jour, sur un prélèvement fait avec les précautions habituelles d'asepsie, les tubes qui contiennent des nitrites, c'est-à-dire ceux dans lesquels commence à se produire une culture. Le milieu doit contenir une quantité suffisante de nitrate pour que les nitrites ne soient pas d'apparition trop fugace et donc qu'ils soient faciles à mettre en évidence. La condition est réalisée lorsque la valeur du rapport C/N du milieu n'est pas sensiblement supérieure à 10. Le nitrate de potassium est donc introduit à la concentration de 0,3 g p. 1 000. En outre, le milieu contient les sels minéraux habituels qui sont apportés par la solution de Winogradsky, employée à la dose de 50 ml par litre.

Tel qu'il est décrit, le milieu permet déjà la croissance de nombreux germes amylolytiques. Cependant, certaines espèces, qui sont souvent parmi les mieux représentées *en nombre* dans les sols, ne peuvent se développer sur un milieu aussi simple. La sensibilité de ce dernier doit être augmentée sans que pour autant il perde son électivité. On y parvient, dans une certaine mesure, par l'introduction d'une petite quantité d'une solution de micro-éléments. Mais c'est surtout l'apport d'extrait de terre qui aura le plus d'effet, par les substances organiques stimulantes qu'il contient à l'état de traces.

On pourrait craindre, cependant, que l'emploi de l'extrait de terre fasse perdre au milieu de culture une partie de son électivité. Pour éclaircir ce problème, nous avons préparé une série de milieux ne contenant pas d'amidon, mais des quantités croissantes d'extrait de terre : respectivement 0,25, 0,5, 1, 1,5, 3, 4,5, 6, 9 et 30 ml p. 1 000 d'extrait de terre. Après les avoir ensemencés à l'aide de suspensions-dilutions de terre de jardin, nous avons cherché pour quelle dose d'extrait commençaient à apparaître les nitrites. Après huit jours de culture, nous avons constaté qu'il n'apparaissait pas de nitrites, même aux dilutions les plus élevées, lorsque les milieux ne contenaient pas plus de 3 p. 1 000 d'extrait. Jusqu'à 9 p. 1 000 les nitrites apparaissaient progressivement, à l'état de traces et dans les deux premières dilutions seulement. Après un mois, on notait généralement des nitrites pour tous les milieux, mais seulement dans ces deux mêmes dilutions qui n'ont d'ailleurs qu'un intérêt relatif du fait des quantités de terre relativement importantes provenant de l'inoculat.

En fonction de ces résultats, nous avons finalement choisi d'introduire 3 ml d'extrait de terre par litre de milieu. Nous utilisons un extrait de terreau préparé de la façon suivante : on mélange à parties égales (en poids) du terreau de jardinier et de l'eau du robinet ; on laisse en contact pendant vingt-quatre heures puis on autoclave à 120-130° C pendant trente minutes. On filtre sur papier, puis à la bougie (L5 si possible), afin d'obtenir un liquide limpide. On le garde après une nouvelle stérilisation à 120° C pendant vingt-trente minutes. A la longue, il peut se former un léger dépôt que l'on élimine. L'extrait

de terreau est toujours facile à filtrer et à obtenir très clair. Il n'en est pas de même pour toutes les terres, surtout les terres argileuses. De plus, nous obtenons ainsi un extrait dont la composition semble assez régulière et homogène d'une fois à l'autre. L'extrait que nous utilisons contient en moyenne de 0,3 à 0,4 g p. 1 000 de substances organiques dont l'analyse donne :

C = 23 p. 100 H = 3,1 p. 100 N = 2,0 p. 100

Le rapport C/N de l'extrait est donc de 11,5.

Comme nous introduisons 3 ml de cet extrait par litre de milieu, la quantité de substance organique apportée est au maximum de 1,2 mg par litre, ce qui est absolument négligeable par rapport à la quantité d'amidon mise en jeu.

De ces considérations, il suit que la formule du milieu que nous utilisons est la suivante :

Amidon soluble (Prolabo)	1 g
Nitrate de potassium	0,3 g
Carbonate de calcium	1 g
Solution d'oligo-éléments (1)	1 ml
Extrait de terre	3 ml
Solution standard de Winogradsky	50 ml
Eau distillée	Q. S. P. 1 000 ml

Le pH est ajusté à 7,0. On répartit en tubes de 17, à raison de 5 ml par tube. On stérilise à 112° C, pendant vingt minutes.

III. — MODE DE LECTURE DES RÉSULTATS.

Les tubes sontensemencés chacun de 1 ml d'une suspension-dilution de terre, à raison de 4 ou 5 tubes par dilution (de 10 en 10).

Chaque jour, on prélève stérilement 0,2 à 0,3 ml environ du contenu de chacun des tubes. Cette petite quantité est répartie dans deux tubes à hémolyse : on a donc environ de 0,1 à 0,15 ml de prélèvement par tube à hémolyse. Dans l'un de ces tubes, on ajoute I à II gouttes du mélange à parties égales des réactifs A et B de Griess (Réact. A : acide sulfanilique en solution à 1 p. 100 dans l'acide acétique à 30 p. 100. Solubiliser à chaud. Réact. B : α -naphtylamine 0,3 g que l'on fait bouillir dans 70 ml d'eau distillée. On laisse quelques heures. On décante et l'on ajoute 30 ml

(1) La composition de la solution d'oligo-éléments est la suivante (J. Augier) :

Molybdate de K.....	0,5 g	Iodure de K	0,1 g
Borate de Na	0,2 g	Fluorure de Na	0,1 g
Sulfate de Co	0,2 g	Bromure de Na	0,1 g
Sulfate d'Al	0,1 g	Chlorure de Zn	0,05 g
Sulfate de Cu	0,1 g	Eau distillée... Q. S. P.	1 000 ml
Sulfate de Cd	0,1 g		

On ajoute ensuite 1 ml de silicate de sodium à 30° B, puis on fait passer un courant de CO₂ dans la solution.

d'acide acétique à 30 p. 100), on note la teinte obtenue après cinq à dix minutes.

Dans l'autre tube, on ajoute I à II gouttes d'une solution iodo-iodurée (solution de lugol du Codex) et contenant 10 g d'iode par litre. Cette solution est préalablement diluée avant l'emploi au 1/5 environ.

On fait de même avec du milieu témoin non ensemencé (témoin n° 1) et avec du milieu sans amidon, ensemencé par une seule dilution, en général la dilution 10^{-4} , de la terre étudiée (témoin n° 2).

Pour la recherche des nitrites, on considérera comme positifs (quelle que soit l'importance de cette positivité), tous les tubes qui donnent une teinte plus rose que le témoin n° 2. Le témoin n° 1 sert à vérifier qu'au cours de la stérilisation il n'y ait pas eu de réductions de nitrates en nitrites (il est normal que le témoin soit très légèrement rose, car il est très difficile de trouver des produits complètement exempts de nitrites, surtout s'ils ont été gardés un certain temps).

Dans la recherche de l'amidon, on notera comme négatif tout tube qui ne donnera aucune teinte bleue, violette ou chamois foncé. Le témoin n° 1, lui, doit être bleu foncé après addition d'iode, ce qui indique qu'il n'y a pas eu d'hydrolyse importante de l'amidon au cours du passage à l'autoclave. Le n° 2 prend la couleur de l'iode ajouté, c'est-à-dire l'aspect que doit avoir un tube négatif. Il semble cependant préférable de noter comme négatifs les tubes qui montrent encore une réaction légèrement positive. En effet, on a intérêt à rechercher le plus possible le moment exact où la culture arrive à la fin de sa phase exponentielle de croissance, ce qui correspond à une consommation de 90 p. 100 du substrat environ.

Les lectures devront être faites après un, deux, trois, quatre, cinq, sept, neuf, douze et éventuellement dix-neuf et trente jours. Les résultats sont portés dans un tableau qui permettra d'effectuer les calculs nécessaires à la représentation graphique de l'activité amylytique des sols (*Cf.* plus bas).

Notons enfin que tout tube devenu à un moment donné positif pour les nitrites sera par la suite noté comme positif dans ce tableau même si les nitrites ont disparu.

IV. — REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES RÉSULTATS : LA DIFFÉRENTIELLE.

Etudiant l'hémicellulolyse [2], l'un de nous avait employé une méthode de calcul qui avait pour but de déterminer la dilution donnant 50 p. 100 de résultats positifs et 50 p. 100 de résultats négatifs.

Actuellement ce mode de calcul nous paraît moins bien adapté aux nécessités du calcul statistique et nous préférons déterminer le « niveau moyen » atteint dans l'échelle des dilutions, ce qui permet, le cas échéant, d'utiliser les tables de Fischer [6].

En désignant par Nm ce niveau moyen, on a :

$$Nm = \frac{T}{n} \log a$$

où n est le nombre de tubesensemencés à chaque dilution ;

$\log a$, le logarithme de la raison (a) des dilutions (le plus souvent $a = 10$) ;

T , le total de tubes positifs (ou négatifs, selon qu'il s'agit des nitrites ou de l'amidon) comptés à partir de la dilution 10^0 comprise (c'est-à-dire à partir de celle où l'on ensemence la terre elle-même).

En réalité cette dilution 10^0 n'est jamaisensemencée réellement, car elle équivaldrait à introduire 1 g de terre dans chacun des tubes de culture de cette dilution ; elle n'en doit pas moins être comptée.

Prenons un exemple. Nous avons utilisé 5 tubes par dilution.

Supposons qu'à une certaine lecture, on ait :

A la dilution 10^0	5 tubes positifs
A la dilution 10^{-1}	5 tubes positifs
A la dilution 10^{-2}	5 tubes positifs
A la dilution 10^{-3}	5 tubes positifs
A la dilution 10^{-4}	5 tubes positifs
A la dilution 10^{-5}	4 tubes positifs
A la dilution 10^{-6}	2 tubes positifs
A la dilution 10^{-7}	0 tube positif
A la dilution 10^{-8}	0 tube positif
A la dilution 10^{-9}	0 tube positif

Le nombre total de tubes positifs est de 31. La raison des dilutions étant 10 le Nm sera donc :

$$Nm = \frac{31}{5} \log 10 = 6,2.$$

On fera ce calcul pour chaque lecture, c'est-à-dire au bout des temps indiqués plus haut.

L'ensemble des résultats sera porté sur des coordonnées rectangulaires, les Nm étant en ordonnées et les temps en abscisses. On obtient ainsi deux courbes, l'une représentant le moment où les cultures commencent leur croissance : c'est la courbe des nitrites, ou *courbe de latence* ; l'autre sera la *courbe de fin de croissance*, ou courbe de disparition de l'amidon.

Pour obtenir la courbe réelle d'activité, ou courbe « différentielle », on reporte point par point, sur le même système de coordonnées les valeurs des différences entre les deux courbes. Etant mesurées parallèlement aux abscisses, ces différences portent donc sur le temps.

V. — EXAMEN DE QUELQUES CAS.

Les figures 1 et 2 donnent le tracé des courbes obtenues après étude de plusieurs terres à l'aide de la technique et du milieu de culture que nous venons de décrire.

Avant d'examiner la signification des résultats obtenus avec les

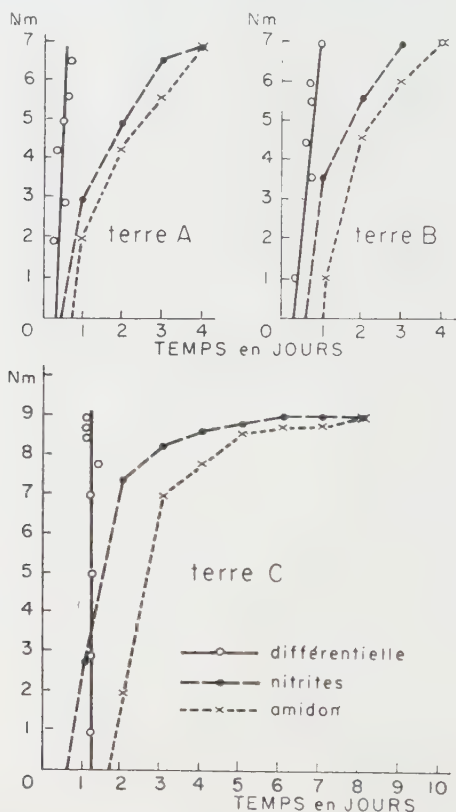


FIG. 1.

5 terres analysées, il nous paraît nécessaire de préciser ce que nous entendons lorsque nous parlons de « l'activité » d'une terre.

On dit généralement qu'un germe est d'autant plus actif que son taux de croissance est plus élevé. Dans le cas qui nous occupe, la différentielle donne l'activité de la flore qui s'est développée dans les tubes de culture en nous renseignant sur le taux

de croissance des germes et les variations de ce dernier. La différentielle est d'autant plus proche des ordonnées que le taux de croissance *in vitro* est plus fort : en effet, la distance entre la différentielle et l'ordonnée représente le temps mis par les germes à chaque dilution pour consommer le substrat ; plus ce temps est faible, plus le taux de croissance est élevé. La différentielle nous renseignant donc sur le taux de croissance, nous dirons que plus elle est proche des ordonnées plus la flore est active, et qu'inversement plus elle s'en éloigne moins la flore est active.

La figure 1 montre les courbes obtenues après l'étude de ces deux terres A et B.

TERRES A ET B prélevées dans une parcelle de la forêt de la Verrière-du Gros-Bois (Doubs), sous un perchis de jeunes hêtres en régénération. Altitude : 450 mètres. pH = 6.

a) *Courbe A* : Elle représente l'activité amylolytique de la terre immédiatement après le prélèvement. Elle montre une différentielle régulièrement verticale, très proche des ordonnées. Cela montre que cette terre contient des germes amylolytiques particulièrement actifs et dont l'activité est égale et homogène jusqu'à la dilution limite correspondant au niveau moyen 7.

b) *Courbe B* : Etablie après une conservation de la terre en bocal pendant deux mois environ. Nous constatons que la flore reste homogène, mais qu'elle est moins active (la distance entre la différentielle et les ordonnées est plus grande). Le niveau moyen atteint reste toujours 7. Nous voyons ainsi que la conservation de la terre a eu pour résultat une diminution progressive de son activité.

TERRE C : Terre de jardin, Besançon. pH = 6,5.

Comme pour la terre précédente il s'agit d'une flore amylolytique d'activité homogène. De plus, elle atteint le niveau moyen 9 : les germes y sont donc cent fois plus nombreux que dans la terre précédente. Cependant, la distance de la différentielle aux ordonnées est plus grande que dans les deux exemples précédents. Nous sommes donc en présence d'une flore amylolytique très nombreuse mais d'activité moyenne.

Ces deux terres renferment donc des flores amylolytiques sensiblement homogènes, donnant par conséquent une différentielle linéaire. Les terres suivantes (fig. 2, terres D, E et F) vont nous fournir trois exemples de flores amylolytiques non homogènes.

TERRE D : Sol fortement lessivé, à sous-sol imperméable (Gley) provenant d'une forêt particulière à Fredy (Haute-Saône), composée d'une futaie claire de chênes rouvres et de hêtres, avec

taches de bouleaux et de trembles. Altitude : 250 m. pH = 5 ; C/N = 15,8.

Cette terre semble renfermer au moins deux flores amylolytiques différentes, comme le montre la forme de la différentielle. On note d'abord la présence d'une flore active, mais très peu nombreuse

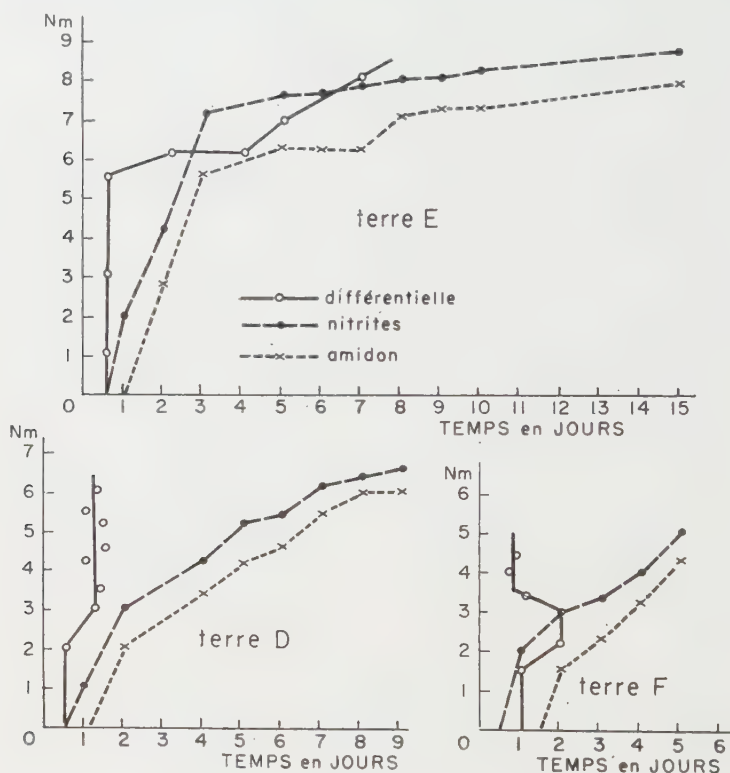


FIG. 2.

(jusqu'au niveau moyen 2, environ). Puis la différentielle s'écarte fortement, ce qui indique que la flore suivante est moins active. Cette deuxième flore correspond à un niveau moyen 6.

TERRE E : Terre provenant d'une parcelle de la forêt de Vercel (Doubs). Futaie de sapin blanc, sur sol lessivé marmorisé. Altitude : 800 m. pH = 5,6 ; C/N = 17.

Comme précédemment on note une flore active jusqu'au niveau

moyen 5,7. Une flore peu active lui succède jusqu'au niveau 7, puis à cette dernière, une nouvelle flore très peu active jusqu'au niveau 8 et même 8,5.

TERRE F : Humus brut, prélevé sous *Rhododendron ferrugineux*. Sol podzolique. Altitude : environ 1 900 m. Région du col du Grand Saint-Bernard (Suisse). pH = 4.

Cette terre renferme une flore très spéciale, qui soulève un problème non encore résolu : celui d'une flore moyennement active jusque vers le niveau 2, ensuite moins active jusqu'au niveau 3, puis paradoxalement plus active jusqu'au niveau 4,3.

L'interprétation de ce cas est très délicate. Nous avons tendance à penser que jusqu'au niveau moyen 3 existe une flore antibiotique vis-à-vis de la flore amylolytique qui s'étend jusqu'au niveau 4,3, mais non antibiotique pour celle qui s'étend jusqu'à 2. Il n'est pas interdit de penser, aussi, que la flore qui s'étend de 3 à 4,3 est elle-même fortement antibiotique pour celle qui va de 0 à 2, mais que cette antibiose ne se manifeste qu'à partir du niveau moyen 2, lorsque la première flore se raréfie suffisamment. La zone entre les niveaux 2 et 3 pourrait être alors une zone contestée où les germes de la deuxième flore empêcheraient ceux de la première de continuer à se développer, mais ne seraient pas encore en mesure d'attaquer suffisamment le substrat (enzymes adaptatifs ?) ou encore seraient eux-mêmes en butte aux attaques des premiers.

De plus, notre première interprétation soulève un problème difficile : pourquoi la flore antibiotique est-elle moins nombreuse que la flore sensible ? Nous n'avons pour le moment aucune explication satisfaisante à donner. Tout au plus peut-on suggérer que dans le sol les germes à activité antibiotique correspondant au niveau 3 n'ont plus cette action sur ceux de la flore qui s'étend jusqu'à 4,3 ou qu'elle est entravée par un autre facteur que l'expérience présente ne permet pas de déceler.

VI. — ESSAI D'INTERPRÉTATION DE LA NOTION D'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE D'UN SOL.

Nous constatons ici, comme nous l'avons déjà vu par d'autres moyens [4] qu'en général c'est la flore représentée par les individus les plus nombreux qui est la moins active, c'est-à-dire celle dont le taux de croissance est le plus bas. Cette constatation est évidemment très paradoxale, car si cette flore est la moins active, comment peut-elle être aussi la plus nombreuse ?

L'interprétation approfondie de ce problème est en cours d'expérimentation. Il semble bien cependant, que parmi plusieurs hypo-

thèses possibles pour expliquer nos constatations, l'une au moins soit très vraisemblable.

La partie de la flore qui se révèle très active *in vitro* n'est pas forcément celle qui est active au moment du prélèvement. Son activité est alors potentielle : il faudra introduire de l'amidon dans le sol pour que ce soit elle qui domine (c'est le cas des terres C et D). La partie de la flore réellement active au moment du prélèvement (activité actuelle) est bien, certes la plus nombreuse ; *in vitro*, elle se montre moins active que la première. Ce paradoxe n'est qu'apparent. Son explication consiste à remarquer que dans le sol les concentrations en sources énergétiques sont très faibles et que dans ce cas, les germes à très fort taux de croissance sont défavorisés par rapport à ceux dont le taux de croissance est faible. Monod [7] a montré, en effet, que le taux de croissance maximum d'un germe décroît très vite lorsque la concentration en source énergétique baisse. Il semble que dans le cas des germes du sol le taux de croissance des germes très actifs baisse plus vite encore que celui des germes à faible taux de croissance lorsque la concentration en source énergétique est faible.

Enfin, pour le cas des terres A et B, où les taux de croissance restent élevés jusqu'au niveau moyen le plus fort, nous pensons qu'il s'agit probablement d'un effet zymogène récent, dû peut-être à un apport de substance amylacée ou plus vraisemblablement d'autres substances ne donnant pas le phénomène de diauxie [7] avec l'amidon.

RÉSUMÉ.

Dans cette note, les auteurs proposent un milieu de culture électif pour amylolytiques dont la sensibilité est portée à son maximum par l'adjonction d'oligo-éléments et de 3 ml p. 1 000 d'extrait de terre, cette quantité n'altérant pas la spécificité du milieu. Ce milieu estensemencé par des dilutions-suspensions de terre.

L'activité, c'est-à-dire la vitesse de croissance des germes amylolytiques, est déterminée par la méthode dite « en différentielle » qui consiste à tracer, en fonction du temps et des dilutions, la courbe d'activité réelle des amylolytiques présents à chaque dilution de terre, en prenant la différence pour chaque dilution entre le début et la fin de la croissance bactérienne.

Les résultats montrent que selon les terres la flore amylolytique est, soit homogène dans son activité, soit formée de plusieurs flores d'activité différente, la moins active *in vitro* étant celle qui, dans le sol, est la mieux représentée en nombre.

Les auteurs expliquent ce dernier paradoxe par la distinction qui existe entre l'activité *in vitro* et l'activité *in situ*. *In vitro* ce sont les germes à taux de croissance élevé en présence de concentration forte en substrat qui se manifestent, tandis que, *in situ*, ces mêmes germes ont un taux de croissance beaucoup plus faible à cause de la très faible teneur en substance énergétique immédiatement utilisable dans la terre. Les amylolytiques à taux de croissance faible *in vitro* ont *in situ* leur taux de croissance relativement moins diminué que les précédents.

SUMMARY

AMYLOLYTIC ACTIVITY OF SOILS.

METHOD OF STUDY AND INTERPRETATION.

The authors describe a medium for the elective culture of amylolytic germs; the sensitivity of this medium is considerably increased by addition of trace-elements and 3 ml/1 000 of soil extract. The medium is seeded with soil dilutions-suspensions.

The activity (i. d. the growth-rate) of the germs is determined by the « differential » method.

The findings show that, according to the soils, the amylolytic flora is either homogeneous as to its activity, or is constituted of several florae possessing different activities, the *in vitro* less active one being the most numerous in the soil.

This apparent paradox might be explained by a distinction between *in vitro* and *in situ* activities. *In vitro*, the germs possessing a high growth-rate in presence of high concentrations of substrate appear first, whereas *in situ* these same germs have a much lower growth-rate, because of the low concentration of energetic substances present in the soil. The *in situ* growth-rate of the amylolytic germs possessing low growth-rate *in vitro* is less decreased than that of the *in vitro* high growth-rate germs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 217.
- [2] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 161.
- [3] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 637.
- [4] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 369.
- [5] BARJAC (H. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 84.
- [6] FISCHER (R. A.) et YATES (F.). *Statistical tables for biological and medical research*, Londres, 1953.
- [7] MONOD (J.). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann et C^{ie}, Paris, 1942.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 5 mai 1960.

Présidence de M. Robert FASQUELLE.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE COMPARÉE DE L'AGGLUTINATION DES HÉMATIES DE POUSSIN DANS LES HÉPATITES INFECTIEUSES DITES VIRALES ET DANS D'AUTRES AFFECTIONS HÉPATIQUES

par J. THIVOLET et H. DUSONCHET.

(Présenté par R. SOHIER).

(Laboratoire d'Hygiène [professeur SOHIER]
de la Faculté de Médecine de Lyon)

Le diagnostic d'hépatite infectieuse, dite virale, habituellement posé en fonction de données cliniques, biologiques et épidémiologiques, comporte aujourd'hui encore une part d'incertitude quelquefois très importante. De nombreux travaux ont été entrepris afin de mettre en évidence dans les sérums prélevés pendant la phase aiguë ou la convalescence des hépatites des anticorps spécifiques ou, à défaut, des modifications sérologiques paraspécifiques, susceptibles d'apporter une contribution au diagnostic étiologique.

C'est dans cet espoir que nous avons repris la réaction décrite récemment par W. P. Havens. Elle met en évidence dans les sérums prélevés au cours des hépatites virales des propriétés hémagglutinantes vis-à-vis d'hématies de poussins de vingt-quatre heures.

TECHNIQUE. — I. Nous rappelons la technique proposée par Havens que nous avons utilisée.

Préparation des sérums. — Les sérums, frais ou conservés à -20° , subissent une délipidation par l'action successive d'acétone (2 fois), d'éther acétone puis d'éther (2 fois). Pour 0,5 ml de sérum, on utilise un volume de 10 ml de solvant. Entre chaque extraction, le culot protéique est récupéré par une centrifugation de cinq minutes à 1 500 t/min., puis remis en suspension

dans les solvants. A la fin de cette délipidation, le sérum est reconstitué à une dilution de 1/10 dans une solution tamponnée boratée à pH 9. Toutes ces opérations doivent être conduites à +4°. Le sérum reconstitué est conservé à -20° jusqu'à l'utilisation.

Préparation de la suspension globulaire. — Le sang de poussins d'un jour est recueilli en liquide d'Alsever, lavé et mis en suspension à 10 p. 100 du culot en sérum physiologique. Conservation à +4° C.

Technique du test hémagglutinant. — Les sérums reconstitués au 1/10 sont décongelés à la température du laboratoire, et on réalise des dilutions en progression géométrique décroissante de raison 2 à l'aide du tampon boraté glacé.

On procède alors à l'addition des hématies : on prépare extemporanément, à partir de la suspension à 10 p. 100, une suspension à 0,25 p. 100 dans une solution tampon phosphaté ou « virus-adjusting diluent » (V. A. D.).

Cette suspension, également conservée dans un bain de glace, est répartie à raison de 0,5 ml par tube.

Les tubes de réaction sont, après une agitation vigoureuse, placés au réfrigérateur à 4° C.

Lecture. — Elle est effectuée après seize à dix-huit heures de séjour à 4° C immédiatement après la sortie des tubes du réfrigérateur.

La réaction est notée d'une croix (+) à quatre croix (++++), selon l'intensité et la grosseur des agglutinats examinés à l'aide d'un miroir concave. Une réaction négative ne donne lieu à aucune agglutination visible dans ces conditions : les hématies sédimentent dans ce cas en une pastille homogène, parfaitement circulaire et à bords nets. Lorsque de petits agglutinats entourent une pastille encore nettement visible, la réaction est notée une croix (+). Lorsque des agglutinats plus apparents entourent une pastille moins homogène dont la périphérie est crénelée, la réaction est notée (++) . Elle est notée (+++) lorsque les hématies paraissent entièrement agglutinées et sédimentent en une pellicule dont les bords commencent à retomber. La réaction est enfin notée (++++) lorsque les agglutinats se sont décollés : les hématies sédimentent alors en une pastille hétérogène et exclusivement constituée d'agglutinats.

En fait, il n'a pas été tenu compte de l'intensité du phénomène hémagglutinant observé dans les premiers tubes de la galerie ou dans la dilution limite : nous avons simplement déterminé la dilution la plus élevée du sérum qui permet d'observer une réaction d'hémagglutination notée au minimum d'une croix (+), le titre étant alors exprimé par cette dilution limite.

II. Facteurs susceptibles d'influencer la réaction.

A. Les sérums. — Le chauffage préalable à 56° pendant trente minutes ne modifie pas l'intensité de l'hémagglutination qui ne paraît pas non plus influencée par le stockage à -20° pendant quatre mois.

B. Les hématies. — L'âge des poussins est un facteur important. Les résultats obtenus avec des animaux de plus de deux jours traduisent une baisse de la sensibilité de la réaction. La race paraît indifférente. Des tests pratiqués avec des hématies des trois races, New Hampshire, Rhode-Island, croisement Sussex et Rhode-Island, ont donné les mêmes résultats.

La conservation des hématies ne doit pas être prolongée au-delà de quarante-huit heures. L'utilisation d'hématies formolées selon la technique proposée par Fauconnier s'est avérée impossible, la réaction étant alors illisible.

C. La température d'incubation. — Une heure d'incubation à 37° intercalée avant le contact de dix-huit heures à +4° n'influence pas les résultats.

RÉSULTATS OBTENUS AU COURS DE L'HÉPATITE DITE VIRALE. — La réaction a été pratiquée sur 65 sérums prélevés chez 37 malades atteints d'hépatite dite virale ; 162 autres sérums provenant de sujets atteints d'autres affections hépatiques ou hépato-vésiculaires ou d'autres maladies ne touchant pas le foie ont été comparativement examinés.

Nous avons considéré comme positif tout sérum donnant au minimum une réaction d'hémagglutination notée d'une croix (+) dans la dilution au 1/80.

Les titres d'hémagglutination se répartissent ainsi pour les sérums prélevés au cours d'hépatites virales (tableau I).

TABLEAU I.

	NOMBRE de résultats positifs pour chaque dilution (*)								% de positivité
	Nbre total	1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
Observations	37	0	2	5	5	13	9	2	54,85
Sérums	65	1	5	11	9	26	10	3	50

(*) Il a été tenu compte uniquement, dans la constitution de ce tableau, des résultats donnés par les dilutions limites.

Le pourcentage global de positivité est donc de 64,86. Plusieurs sérums présentent un titre de 1/320 qui n'a été rencontré dans aucun des autres sérums testés, provenant d'autres maladies.

L'évolution dans le temps fait ressortir :

1° Une augmentation du pouvoir hémagglutinant pendant la phase aiguë de la maladie.

2° Un maximum se situant vers la fin de la période aiguë et même pendant la convalescence, à un moment où les signes cliniques et biologiques régressent.

Dans les groupes témoins étudiés, le pourcentage de positivité atteint 19,04 p. 100 dans le groupe des cirrhoses. Il est de 4,25 p. 100 dans le groupe des ictères par rétention (voir tableau II), ce qui comporte des déductions diagnostiques utiles, de 23,07 p. 100 dans un groupe d'affections hépatiques ou hépato-vésiculaires de classement difficile, de 0 p. 100 dans les ictères hémolytiques, et de 0 p. 100 au cours d'affections n'atteignant pas le foie.

Le mécanisme de la réaction et la nature même de ce facteur hémagglutinant sont mal élucidés. Le problème est le même pour les assez nombreuses réactions d'hémagglutination proposées jusqu'ici dans l'hépatite dite virale. Si l'on excepte Rubin, Kemp et Bennett qui soutiennent assez curieusement l'hypothèse d'une action virale directe, la plupart des auteurs, Eaton, Bang, Hoyt et Morrison, Colobert et coll., Havens, font intervenir des anticorps probablement non spécifiques, peut-être liés à la dégradation hépatique, et ayant alors la signification

TABLEAU II.

Diagnostic	Hépatite infect.	Cirrhose	Ictère rétention	Ictère hémolyt.	Hépatiques divers	Divers non hépatiques
Nombre d'observations	37	63	47	7	13	11
Pourcentage de positivité	64,86	19,04	4,44	0	23,07	0
Nombre de sérums testés	65	74	56	8	13	11
Pourcentage de positivité	60	17,55	4,25	0	21,42	0

d'auto-anticorps, agissant dans ces réactions de manière hétérophile. Le temps et l'horaire d'apparition des agglutinines nous paraissent un argument en faveur de cette dernière interprétation.

RÉSUMÉ. — Le pouvoir agglutinant pour les hématies de poussin des 65 sérums de 37 sujets atteints d'hépatite infectieuse dite virale a été étudié par la méthode proposée par W. P. Havens. Les résultats obtenus sont voisins de ceux relevés par cet auteur, puisque 64,86 p. 100 des sérums étaient agglutinants, les titres les plus élevés étant observés à la convalescence.

A titre comparatif, les agglutinines pour les hématies de poussin ont été recherchées dans 162 sérums de sujets atteints d'autres affections hépatiques ou hépato-vésiculaires et de sujets témoins atteints de maladies non hépatiques. Le pourcentage de positivité le plus élevé a été de 23,07 p. 100 dans un groupe d'atteintes hépatiques diverses difficiles à classer. Le pourcentage n'a pas dépassé 19,04 p. 100 dans le groupe des cirrhoses, 4,25 p. 100 dans le groupe des ictères par rétention. Il a été de 0 p. 100 dans le groupe des ictères hémolytiques et dans le groupe témoin. Ceci comporte des déductions diagnostiques utiles.

Un certain nombre de facteurs pouvant intervenir dans les réactions ont été étudiés. Leur mécanisme demeure encore imprécis.

SUMMARY

COMPARATIVE STUDIES ON AGGLUTINATION OF CHICKEN ERYTHROCYTES IN THE SO-CALLED VIRAL HEPATITIS AND IN OTHER HEPATIC DISEASES.

The hemagglutinating capacity of 65 serum samples taken from 37 individuals suffering from viral hepatitis has been studied by means of W. P. Havens' method. The findings are similar to those of Havens : 64,86 p. 100 of the sera were positive, the highest titers being observed during convalescence. 162 sera from individuals suffering from other hepatic or hepato-vesicular diseases and from controls suffering from non hepatic diseases, were also examined for the presence of these

agglutinins. The highest percentage of positive reactions (23,07) was found in a group of patients suffering from various hepatic diseases. The percentage was 19,04 p. 100 in cirrhosis, 4,24 p. 100 in retention jaundice, 0 p. 100 in hemolytic jaundice and in controls. This is important for the diagnosis of these diseases.

Certain factors which might play a role in the reaction were also studied. Their mechanism is not clear.

BIBLIOGRAPHIE

- HAVENS (W. P. Jr.). *New Engl. J. Med.*, 1958, **259**, 1202-1206.
 FAUCONNIER (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 777.
 HOYT (R. E.) et MORRISON (L. M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 547-549.
 MORRISON (L. M.) et HOYT (R. E.). *J. Lab. clin. Med.*, 1957, **49**, 774-778.
 RUBIN (B. A.), KEMP (H. A.) et BENETT (H. D.). *Science*, 1957, **126**, 1117.
 COLOBERT (L.), MAITRE (P.) et DUFFRENE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 560-570.
 EATON (M. D.), MURPHY (W. D.) et HANFORD (V. L.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 539-557.
 BANG (F. B.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1949, **84**, 497-506.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION CATIONIQUE DU MILIEU SUR LA FIXATION DES BACTÉRIOPHAGES SUR LES RÉCEPTEURS BACTÉRIENS ISOLÉS

par J. BEUMER et J. DIRKX.

(Institut Pasteur de Bruxelles)

Nous avons décrit, dans une note précédente [1], les méthodes qui nous ont permis d'extraire des souches de *Shigella* des substances réceptrices des phages du bacille lysogène de Lisbonne. Au cours de ce travail, il est apparu que l'activité réceptrice de nos extraits bactériens, vis-à-vis de certains phages surtout, dépend manifestement de la composition du milieu où l'on recherche la fixation, et plus précisément de la nature et de la concentration des cations dans ce milieu. L'influence de la composition cationique du milieu sur la fixation des bactériophages sur les bactéries vivantes est un fait bien connu, spécialement depuis les recherches effectuées par Puck et ses collaborateurs [2] sur les phages de la série T. Nos propres travaux [3, 4] ont bien établi que l'un des phages du B. Lisbonne, le phage H-SHPB, ne se fixe sur les bactéries vivantes que dans des limites précises de concentration cationique et que celles-ci varient avec la souche sensible utilisée, ou plus précisément

selon le caractère S ou R de cette dernière. Nous espérons pouvoir confirmer ces faits en utilisant, au lieu de bactéries vivantes, les substances réceptrices extraites de ces bactéries. Nos premiers résultats, que nous exposons ici, paraissent démontrer qu'il en est bien ainsi.

MATÉRIEL.

Les souches de *Shigella* et les phages du B. Lisbonne sont ceux utilisés dans les recherches décrites dans la note précédente [4].

MÉTHODES.

Les méthodes d'isolement des substances réceptrices ont été décrites précédemment, ainsi que le titrage de leur activité [4]. Cette dernière est exprimée en unités réceptrices par milligramme (1 unité réceptrice = la plus petite concentration d'extrait laissant 50 p. 100 de phage non fixé dans les conditions de l'expérience).

Les milieux utilisés pour la mise en évidence de la fixation des phages sur les extraits bactériens sont à base de milieu LB [5], dilué différemment selon les cas, et dont la concentration en cations est ajustée par addition de solutions concentrées de ceux-ci.

La concentration de l'ion Na^+ dans le milieu LB non dilué est voisine de 0,2 M, celle de l'ion Ca^{++} inférieure à 0,001 M.

Nous avons utilisé principalement quatre milieux de fixation :

I. LB dilué 1/2 en eau distillée ; concentration en Na^+ = 0,1 M ; concentration en Ca^{++} inférieure à 0,0005 M.

II. LB dilué 1/2 en eau distillée ; concentration en Na^+ ajustée à 0,4 M ; concentration en Ca^{++} inférieure à 0,0005 M.

III. LB dilué 1/2 en eau distillée ; concentration en Na^+ ajustée à 0,4 M . addition de 0,005 M Ca^{++} .

IV. LB dilué 1/6 en eau distillée ; concentration en Na^+ = 0,033 M , addition de 0,005 M Ca^{++} .

RÉSULTATS. — Un premier examen nous a montré d'emblée que la fixation du phage H-SHPB sur les récepteurs bactériens isolés est nettement influencée par les conditions cationiques du milieu, tandis que celle du phage H-F6S, par contre, semble l'être à peine. La fixation du phage H+ dépend certainement aussi des conditions cationiques ; celle du phage V probablement moins. Nous nous limiterons ici à l'étude comparative de la fixation des phages H-F6S et H-SHPB.

Comme le montre le tableau I, l'activité réceptrice des extraits des souches F6 S et F263 pour le phage H-F6S est à peu près semblable dans les quatre milieux étudiés : la fixation de ce phage sur les souches S paraît donc peu influencée par la composition cationique du milieu. L'activité réceptrice très faible des extraits des souches R (SHPB et F6 R) pour ce même phage reflète, nous l'avons vu [4], la sensibilité réduite de ces souches à ce phage ; l'emploi d'autres milieux n'a pas permis de déceler une fixation plus importante.

Contrairement à H-F6S, le phage H-SHPB ne se fixe bien sur les extraits bactériens que dans des conditions cationiques bien définies ; de plus ces dernières diffèrent selon que le phage est mis en présence des récepteurs des souches S ou des souches R. Les récepteurs des souches

SHPB et F6 R ne fixent énergiquement H-SHPB que dans un milieu pauvre en Na^+ (0,033 M) et contenant 0,005 M Ca^{++} (milieu IV), tandis que les récepteurs extraits des souches F6 S et F263 présentent leur maximum d'activité vis-à-vis de ce même phage dans un milieu riche

TABLEAU I. — Activité des extraits en unités réceptrices par milligramme en fonction de la composition du milieu de fixation.

Souche	Extrait	Phage H-F6S				Phage H-SHPB			
		Milieux				Milieux			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
SHPB	Aq 68	2	2	2	<2	10	<2	10-50	6,250
F6 S	TCA	6,250	1,250 à 6,250	1,250 à 6,250	1,250	<2	10	6,250	10-50
F6 S	Aq 68	250 à 1,250	250 à 1,250		>250	2	<10	250 à 1,250	50-250
F6 R	Aq 68	<2	<2	2 à 10	<2	10-50	10-50	10-50	1,250
F263	TCA	>31,250	>31,250	>31,250	31,250	2 à 10	10-50	>1,250	2 à 10
F263	Aq 68	1,250 à 6,250	250 à 1,250		250 à 1,250	<2	<2	2	2 à 10

Milieux : I. LB/2 ; II. LB/2. 0,4 M NaCl ; III. LB/2. 0,4 M NaCl + 0,005 M CaCl_2 ; IV. LB/6 + 0,005 M CaCl_2 .

en Na^+ (0,4 M) et contenant 0,005 M Ca^{++} . Comme nous l'avons déjà signalé, les extraits Aq 68 des souches S sont moins actifs que les extraits TCA des mêmes souches ; l'extrait Aq 68 de la souche F263 n'a qu'une activité négligeable vis-à-vis du phage H-SHPB. Toutefois, sauf dans ce dernier cas, l'extrait Aq 68 se comporte comme l'extrait TCA, en fonction de la concentration en cations du milieu.

L'examen des résultats expérimentaux suggère les conclusions suivantes :

1° Un récepteur bactérien peut ne fixer que très faiblement le phage H-SHPB dans un milieu où il fixe très énergiquement le phage H-F6S ; il fixera, par contre, aisément H-SHPB dans un autre milieu. Le phage H-SHPB n'est donc fixé par les récepteurs bactériens isolés que dans des conditions cationiques bien définies.

2° Ces conditions diffèrent selon le récepteur bactérien mis en présence du phage H-SHPB. Les récepteurs extraits des souches S exigent, pour fixer ce phage, une forte concentration en Na^+ (0,4 M) et la présence d'une certaine quantité de Ca^{++} ($\pm$ 0,005 M). L'expérience nous a montré que les ions Na^+ seuls (jusqu'à une concentration 1 M) ne suffisent pas à permettre une fixation maxima du phage H-SHPB ; il en va de même d'une concentration élevée en Ca^{++} (0,04 M) dans un milieu moins riche en Na^+ (0,1 M) que les précédents (0,4 M). Par contre, l'ion Na^+ exerce une véritable inhibition sur la fixation de H-SHPB par les extraits des souches R : en effet, les milieux III et IV contiennent la même quantité de Ca^{++} , mais dans le premier des deux la concentration

en Na^+ est 0,4 M, tandis qu'elle n'est que 0,033 M dans le second ; or c'est dans ce dernier seulement qu'une fixation énergétique se produit.

3° Les conditions cationiques qui permettent une fixation maxima du phage H-SHPB par les récepteurs bactériens isolés sont très comparables à celles qui sont les plus favorables à la fixation sur les bactéries vivantes. En effet, nous avons montré précédemment [4] que les bactéries R ne fixent que 20 à 50 p. 100 du phage H-SHPB en maléate de Na et que cette fixation est inhibée dès que la concentration en Na^+ dépasse 0,04 M ; par contre, ces souches R fixent 100 p. 100 du phage en maléate de Ca 0,002 à 0,004 M. La souche F6 S, par ailleurs, fixe jusqu'à 100 p. 100 du phage H-SHPB dans les solutions de maléate de Na, mais seulement aux concentrations élevées (0,5 à 1 M), qui n'exercent donc pas dans ce cas l'effet inhibiteur qu'elles manifestent vis-à-vis de la fixation sur les souches R. La fixation du phage H-SHPB sur la souche F6 S en maléate de Ca ne s'effectue qu'à des concentrations en Ca^{++} supérieures à celles suffisantes pour les souches R et n'atteint pas la valeur élevée observée avec ces dernières. Beumer-Jochmans et coll. [6] ont montré que la souche F263 se comporte comme la souche F6 S et que le milieu le plus favorable à la fixation et à la pénétration du phage H-SHPB sur ces souches S est celui dans lequel la concentration en Na^+ est de 0,4 M et celle en Ca^{++} d'au moins 0,0001 M. Il semble donc que les conditions cationiques nécessaires à la fixation du phage H-SHPB sur les récepteurs des bactéries vivantes demeurent les mêmes lorsque ces récepteurs sont extraits des germes.

Rappelons, d'autre part, que le phage H-SHPB a été obtenu par passage du phage H-F6S sur la souche SHPB [7]. Ce passage entraîne une modification du phage, augmentant 1 000 fois son efficacité d'étalement sur les souches R (SHPB et F6 R) : de ce fait, alors que le titre de H-F6S sur ces dernières est 200 à 1 000 fois plus faible que sur les souches S (F6 S et F263), celui du phage modifié (H-SHPB) est le même sur les souches S et R. Or, les faits expérimentaux, que nous venons d'exposer, montrent que le passage a modifié le phage de telle manière que les conditions cationiques nécessaires à sa fixation sont très différentes de celles du phage non modifié. Il est vraisemblable que la modification du phage en rapport avec les conditions cationiques de sa fixation porte sur la structure de la queue ; il ne nous est pas possible actuellement de décider si c'est la même modification ou une modification au même niveau, qui est responsable du changement intervenu dans l'efficacité d'étalement du phage sur les souches R.

RÉSUMÉ. — 1° Les conditions cationiques nécessaires à la fixation optima de deux phages sur les récepteurs isolés d'une même souche bactérienne peuvent être différentes.

2° De plus, la fixation d'un phage sur les récepteurs isolés des souches R exige des conditions cationiques très différentes de celles nécessaires à la fixation du même phage sur les récepteurs extraits des souches S.

3° Les conditions cationiques exigées pour la fixation de l'un de nos phages sur les récepteurs isolés des bactéries sont très comparables à celles dans lesquelles ce phage se fixe sur les bactéries vivantes.

SUMMARY

INFLUENCE OF CATIONIC CONSTITUTION OF THE MEDIUM
ON PHAGE FIXATION ONTO ISOLATED BACTERIAL RECEPTORS.

1° Cationic requirements for optimal absorption of two phages on the receptors isolated from the same bacterial strain may differ widely.

2° Moreover, the absorption of one phage on the receptors isolated from R strains requires a cationic environment very different from the one needed for absorption of the same phage on receptors from S strains.

3° Cationic requirements for the absorption of one of our phages on the receptors isolated from the bacterial cells prove to be very similar to the ones needed for absorption on living bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEUMER (J.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960 (sous presse).
- [2] PUCK (T. T.) et TOLMACH (L. J.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **51**, 229.
- [3] BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M. P.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 397.
- [4] BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M. P.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 36.
- [5] BERTANI (G.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 293.
- [6] BEUMER-JOCHMANS (M. P.), DIRKX (J.) et OLEFFE-KOOPMANSCH (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 771.
- [7] BEUMER (J.) et BEUMER-JOCHMANS (M. P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 394.

**L'INFLUENCE DE LA STREPTOMYCINE
SUR LA PRODUCTION DE LA PÉNICILLINASE INDUITE
CHEZ B. CEREUS.**

par G. BAGDASARIAN (*).

[présenté par A. LAMENSANS]

(Institut Pasteur, Service de Chimie Thérapeutique B)

L'activité accrue de deux ou plusieurs antibiotiques administrés ensemble et l'apparition tardive de la résistance dans ces conditions peuvent s'expliquer de plusieurs manières [1]. L'explication la plus simple est une moindre probabilité de la sélection de mutants résistants à plus d'un antibiotique.

Dans certains cas cependant il existe probablement une interaction des antibiotiques entre eux au niveau du microbe, qui provoque l'apparition tardive de la résistance dans ces conditions particulières.

(*) Adresse actuelle : Institut de Tuberculose, ul. Plocka 26, Varsovie, Pologne.

Nous en avons observé un exemple dans nos expériences sur *B. cereus*, chez lequel la production de la pénicillinase induite *in vitro* avec l'acquisition simultanée de la résistance à la pénicilline peut être inhibée par la présence d'autres antibiotiques, agissant probablement sur les processus de la synthèse des protéines.

Nous avons utilisé la souche *B. cereus* 569 cultivée sur un milieu recommandé par Pollock [2] aux fins d'induction de pénicillinase et contenant de l'hydrolysate de caséine, des sels minéraux et des vitamines.

La croissance a eu lieu dans des fioles Fourneau placées sur un agitateur, inoculées d'un même volume de suspension provenant d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose glucosée. Au bout de cinq jours, c'est-à-dire après avoir obtenu une culture épaisse dans la phase stationnaire, on a procédé à l'induction de la pénicillinase par la méthode décrite par Pollock [2]. A cet effet, dans chaque fiole contenant 100 cm³ de culture, on a ajouté toutes les quinze minutes 1 cm³ de solution de benzyl-pénicilline cristalline à 100 unités par centimètre cube.

Ce procédé était pratiqué pendant huit heures, après quoi la culture était laissée dans l'agitateur à l'étuve pendant encore seize heures.

L'activité de la pénicillinase extra-cellulaire a été dosée par la méthode iodométrique ou manométrique après centrifugation de la culture.

Les cultures témoins ne contenaient ni antibiotique, ni autre substance bactériostatique hormis la pénicilline utilisée pour l'induction. Les cultures expérimentales contenaient, en outre, une des substances suivantes : streptomycine 20 µg, chloramphénicol 12 µg, INH 100 µg, PAS 100 µg par centimètre cube. La densité optique des cultures étudiées aussi bien que des cultures témoins mesurée avant et après l'induction n'était modifiée que dans les limites de l'erreur expérimentale. Ceci prouve qu'il n'y avait pas d'inhibition supplémentaire de la croissance par les substances énumérées ci-dessus. Les concentrations de ces substances se situent au-dessous du seuil de sensibilité de notre souche de *B. cereus*, ce qui a été constaté dans une expérience distincte.

Par contre, on a observé de nettes différences dans l'apparition de la pénicillinase extra-cellulaire (fig. 1). Dans la culture témoin ce processus se déroulait rapidement, l'activité la plus élevée étant obtenue au bout de huit heures. Ni l'INH, ni le PAS n'exerçaient une influence sur ce processus. Cependant la présence de la streptomycine, même à une concentration sub-bactériostatique, provoquait une inhibition marquée de la production de pénicillinase, la réduisant presque 7 fois à la huitième heure, ou la réduisant de moitié au bout de vingt-quatre heures. Il s'ensuit que si la production de la pénicillinase n'est pas supprimée, elle est sensiblement retardée par la présence de la streptomycine. Comme il fallait s'y attendre, la synthèse de la pénicillinase est complètement supprimée en présence de chloramphénicol (courbe inférieure).

Afin de vérifier s'il s'agit d'une action sur la production de la pénicillinase et non pas éventuellement d'un ralentissement de la croissance elle-même, on a mesuré la densité optique, qui conservait des valeurs stables, au cours de l'expérience.

Afin de démontrer en outre que l'effet observé consiste à inhiber la production et non pas l'activité de la pénicillinase, on a procédé de la façon suivante. Au filtrat de la culture de *B. cereus* contenant la pénici-

cillinase extra-cellulaire ainsi qu'à une préparation partiellement purifiée de cet enzyme, on ajoutait de la streptomycine ou du chloramphénicol immédiatement avant le dosage de pénicillinase. Ces antibiotiques n'exerçaient aucune influence sur l'enzyme : il n'y avait pas de différence entre le tube-témoin ne contenant pas d'antibiotiques et ceux qui contenaient de la streptomycine ou du chloramphénicol. Ce qui permet de supposer qu'il s'agit d'une action sur la synthèse même de l'enzyme décomposant la pénicilline. Les expériences en cours montreront dans quelle mesure cette action est spécifique, c'est-à-dire, si elle consiste à inhiber la

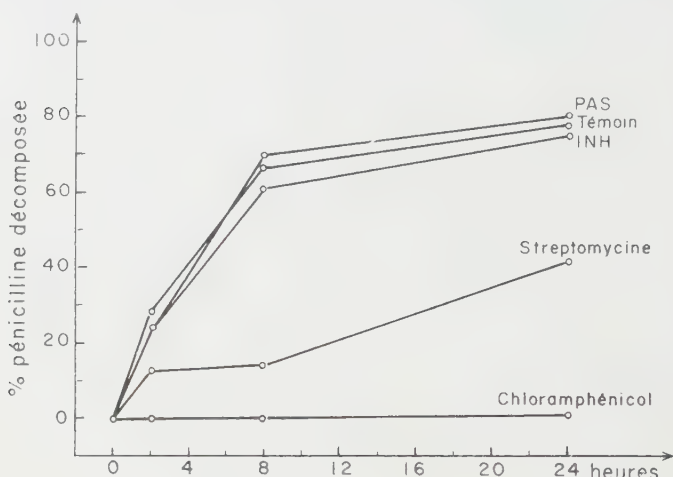


FIG. 1.

synthèse des protéines en général, ou bien si elle n'inhibe que la production de la pénicillinase.

RÉSUMÉ. — En présence de la streptomycine ou du chloramphénicol on observe une inhibition de la production de pénicillinase induite par pénicilline chez *B. cereus* 569, ce qui peut être d'importance pour l'apparition tardive de la résistance dans ce cas particulier.

SUMMARY

THE ACTION OF STREPTOMYCIN ON PENICILLINASE FORMATION BY *B. cereus*.

In cultures of *B. cereus* 569 carried out in presence of streptomycin or chloramphenicol, a certain inhibition of the penicillinase formation induced by penicillin is observed. This fact may be important for the late appearance of resistance to penicillin in this particular case.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRYZON (V.) et SZYBALSKI (W.). *Adv. Genetics*, 1955, **7**, 1.
- [2] POLLOCK (M. R.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1950, **31**, 739 ; 1951, **32**, 387 ; 1952, **33**, 587 ; 1953, **34**, 253.

RÉPARTITION DES MICROORGANISMES CELLULOLYTIQUES DU SOL

I. — LES TECHNIQUES

par M. CHARPENTIER.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

La dégradation de la cellulose dans le sol est un phénomène complexe, réalisé par une flore bactérienne et par des champignons dont la répartition varie avec la nature et l'activité de chaque sol. Il est donc important de rechercher leur isolement sur un milieu sélectif, où toutes les espèces cellulolytiques pourront être représentées.

Différentes méthodes ont jusqu'ici été employées pour mettre en évidence cette flore : méthode utilisant un substrat solide : le silico-gel, préconisé par Winogradsky [1], par Imchenetski et Solntseva [2] ; ou la gélose dont la manipulation est plus aisée : Omelianski [3], Pouchinskaya [4], Stanier [5]. Des milieux liquides ont également été utilisés [5, 6] mais ne permettent pas de distinguer les différents organismes cellulolytiques.

Une méthode utilisant comme support solide le silico-gel nous semble donner la meilleure sélection, à condition de modifier le mode d'ensemencement habituel. Le silico-gel préparé selon la technique originale de Winogradsky [1] est réparti dans une boîte de Pétri (30 ml), puis rigoureusement dialysé et imprégné par 2 ml de la solution minérale suivante :

PO_4HK_2	10 g
NO_3NH_4	3 g
SO_4Mg	5 g
ClNa	1 g
Cl_2Ca	1 g
Cl_3Fe	1 ml
OH_2	Q. S. P. 1 000 ml

et placé à l'étuve à 56° jusqu'à évaporation complète de la solution minérale en excès. Onensemence alors chaque boîte de II gouttes de suspension-dilution de terre au 1/10, 1/50 et 1/100 qu'on répartit uniformément sur la surface du gel. On recouvre, donc après ensemencement, d'une feuille de papier filtre stérile (papier Durieux) qui doit adhérer parfaitement à la surface. Les boîtes sont conservées à l'étuve à 28°, en atmosphère humide, pendant deux à trois semaines. Dès le troisième ou quatrième jour, des colonies bactériennes, souvent colorées, apparaissent sur le papier qui subit dès lors une attaque plus ou moins

profonde et rapide ; les actinomycètes et les champignons se manifestent à partir du dixième jour en général. Il a été possible par cette méthode de mettre en évidence les différents groupes cellulolytiques et d'évaluer leur répartition dans le sol.

Les bactéries cellulolytiques : *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Cytophaga*, apparaissent dès les premiers jours de culture aux dilutions 1/10, 1/50 et 1/100, dans les terres riches et en activité. Les actinomycètes, visibles à partir du dixième jour aux dilutions 1/50 et 1/100, sont fréquents dans les terres en jachère ou dans les terres peu actives. Les champignons se rencontrent avec une fréquence sensiblement équivalente. Les myxobactéries apparaissent souvent après sept à dix jours d'étuve et aux dilutions 1/50 et 1/100 ; elles sont fréquentes dans les terres peu actives ou dans certains sols pauvres (sables) et pourraient manifester un certain antagonisme vis-à-vis des autres bactéries cellulolytiques.

Il semble donc que cette méthode permette la mise en évidence des différents groupements qui participent à la dégradation de la cellulose. Winogradsky préconisait vivement l'emploi du silico-gel, qui permet l'isolement des germes spécifiques avec un maximum de rapidité et de sélectivité. Des analyses comparatives faites sur silico-gel et sur gélose Difco ont confirmé la rapidité et la sélectivité du silico-gel par rapport à la gélose. Cette dernière, même purifiée, possède un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des germes cellulolytiques.

L'ensemencement avec des suspensions-dilutions de terre assure une plus grande spécificité que l'ensemencement avec les grains de terre de Winogradsky. Les germes qui se développent sur le papier filtre sont capables d'utiliser les éléments minéraux de la solution d'imprégnation, et en particulier l'ion NH_4 et le carbone fourni par la feuille de papier. On ne peut envisager l'utilisation de substances d'hydrolyse de la cellulose par d'autres espèces, comme on pouvait le faire par la méthode des grains de terre, la concentration de l'ensemencement laissant possible l'hypothèse d'une association microbienne.

D'autre part cette méthode réalise, sous la feuille de papier, une semi-aérobiose convenant aux bactéries cellulolytiques qui peuvent supporter une tension d'oxygène légèrement réduite [5].

RÉSUMÉ. — L'ensemencement réalisé par suspension-dilution de terre sur silico-gel, recouvert ensuite d'une feuille de papier, permet d'isoler les germes cellulolytiques du sol et de connaître la répartition des groupements : bactéries, actinomycètes, myxobactéries et champignons, en fonction des dilutions.

SUMMARY

DISTRIBUTION OF CELLULOLYTIC MICROORGANISMS IN SOIL.

The technique used (seeding of a soil suspension-dilution on silico-gel in Petri dishes covered with a sheet of paper) permits to isolate soil cellulolytic germs and to know the distribution of their groups : bacteria, actinomycetes, myxobacteria and fungi, according to the dilution.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WINOGRADSKY (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, **43**, 549.
- [2] IMCHENETSKY (A. A.) et SOLNTSEVA (L. I.). *C. R. Acad. Sci.*, U. R. S. S., série Biol., 1936, n° 6, 1115.
- [3] OMELIANSKI (V. L.). *Manuel pratique de microbiologie*. Moscou-Leningrad, 1940.
- [4] POUCHKINSKAYA (O. I.). *Mikrobiologiya*, U. R. S. S., 1954, **23**, 34.
- [5] STANIER (C. Y.). *Bact. Rev.*, 1942, **6**, 143.
- [6] BARJAC (H. DE). *Pédologie* (Belgique), 1957, **7**, 138.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Essais de traitement de la mammite staphylococcique de la vache par vaccination locale, par M. PLOMMET.

Etude biomorphologique et manométrique de l'oxydation enzymatique de quelques composés phénoliques par les glandes vitellines de certains trématodes, par A. DODIN, A. CAPRON et E. R. BRYGOO.

Survie et multiplication du BCG et du bacille tuberculeux chez la souris. II. Comparaison de vaccins BCG lyophilisés préparés à partir de cultures de trois âges différents, par M. PANISSET, J.-C. BENOIT, A. FRAPPIER et J. SAINT-PIERRE.

Association sérum-antibiotiques dans la streptococcie expérimentale de la souris, par F. BOYER.

Etude qualitative et quantitative du pouvoir lipolytique de 86 souches de *Clostridium* anaérobies, par M. SEBALD et A. R. PRÉVOT.

L'identification des mycobactéries par la recherche de l'acide nicotinique, par H. BOISVERT.

AVIS

Le Colloque International sur le Cholestérol, organisé par le Centre d'Informations Sanitaires, aura lieu à la Faculté de Médecine de Paris, les jeudi 17 et vendredi 18 novembre 1960.

La Présidence de ce Colloque sera assurée par M. le professeur Loeper, de l'Académie de Médecine.

Pour tous renseignements, s'adresser : Centre d'Informations Sanitaires, 74, avenue Kléber, Paris, 16^e.

LIVRES REÇUS

E. Darzins. — *The Bacteriology of Tuberculosis*. 1 vol., 488 p., University of Minnesota Press, Minneapolis, 1959.

L'abondance de la littérature sur la bactériologie de la tuberculose est telle que les jeunes générations de chercheurs risquent d'ignorer les travaux étrangers déjà consacrés aux problèmes qu'ils étudient, et de perdre un temps précieux à reproduire des expériences déjà effectuées par leurs prédécesseurs. Pour leur éviter ce travail stérile, l'auteur expose, dans un livre très documenté et parfaitement présenté, nos principales connaissances sur le bacille tuberculeux.

La première partie est consacrée à la morphologie et à la cytologie du bacille, et aux méthodes physiques, biologiques et chimiques d'étude de sa structure cellulaire. La seconde partie traite des sources d'énergie et de la croissance du bacille. La troisième envisage les méthodes d'isolement, de coloration, de culture. Dans la quatrième partie, sont exposées les questions relatives aux divers types de bacilles et à leur pouvoir pathogène. La dernière partie, près de 100 pages, est réservée à l'expérimentation sur l'animal (cobaye, lapin, souris, hamster) et sur l'œuf de poule embryonné ; elle se termine par un chapitre consacré à la protection des travailleurs de laboratoire.

Une importante bibliographie de plus de 50 pages, puisée dans 252 périodiques, et reprise dans deux index d'auteurs et de sujets, complète l'ouvrage.

L'auteur, né en Lettonie, a fréquenté les laboratoires de l'Institut Pasteur de Paris et ceux de l'Institut Rockefeller. Il a travaillé aussi à Copenhague et à Berlin. Il peut ainsi apprécier l'importance de la contribution européenne à la solution des problèmes qu'il expose. En leur réservant, dans un livre de langue anglaise, la place qu'ils méritent, il met à la disposition des chercheurs une documentation véritablement internationale, ce qui n'est pas un des moindres mérites de cet ouvrage.

Ch. G.-R.

Jean Fabre. — *Les œdèmes. Physiopathologie et traitement de la rétention de sel et d'eau*. 1 vol., 344 p., 46 fig. (17 × 25,3), Masson et C^o, édit., Paris, 1959. Prix : 55 NF.

Durant ces vingt-cinq dernières années, nos connaissances sur les œdèmes se sont accumulées avec une accélération qui rend difficile au néophyte l'élaboration d'une conception d'ensemble. Celui-ci sera donc reconnaissant à l'auteur d'avoir clairement exposé les éléments essentiels des problèmes soulevés par les œdèmes.

La première partie de cet ouvrage est un rappel des données récentes sur le métabolisme du sel et de l'eau, notamment de la régulation hormonale et rénale.

La deuxième partie est consacrée à l'analyse des mécanismes générateurs d'œdèmes au cours des différentes affections cardiaques, rénales, hépatiques, endocriniennes, au cours de la grossesse, carence en pro-

tides, en potassium et en vitamine B1 ainsi que dans les affections inflammatoires ou allergiques.

Dans la dernière partie, l'auteur indique les principaux éléments permettant de réaliser un traitement logique, par suppression du sel à l'aide des diurétiques et des corticoïdes et avec l'épuration extra-rénale.

Une bibliographie de près de mille références et un index alphabétique complètent cet excellent ouvrage. Le lecteur sera intéressé par la clarté de l'exposé et la maîtrise de l'auteur, qui juge autant en clinicien qu'en physiologiste et dont la compétence est reconnue dans le domaine du métabolisme des électrolytes et la physiologie de l'aldostérone.

A. E.

Einar Leifson. — *Atlas of bacterial flagellation*. 1 vol., 171 p., Academic Press, New York et Londres, 1960. Prix : 7 \$.

Leifson est l'auteur d'une méthode de coloration en un seul temps des flagelles, qui est actuellement utilisée dans la plupart des laboratoires. Dans ce livre il décrit à nouveau cette méthode avec beaucoup de détails, expose les divers arrangements de flagelles chez les bactéries et leurs relations avec la mobilité, les variations et mutations pouvant survenir dans la forme, l'arrangement et la fonction des flagelles. Enfin le système ciliaire est étudié dans les divers groupes bactériens, et cette partie qui occupe la plus grande partie du livre est abondamment illustrée.

L. L.

J. V. Dacie. — *The haemolytic anaemias congenital and acquired*. Part. I. *The congenital anaemias*. Second edition. 1 vol., 339 p., 118 fig., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1960. Prix : 45 s.

Cette deuxième édition du traité publié par J. V. Dacie est composée de deux volumes, dont le premier comprend les généralités sur l'hémolyse et les méthodes d'étude des anémies hémolytiques, les anémies hémolytiques congénitales comme la maladie hémolytique héréditaire et l'elliptocytose, enfin les anémies hémolytiques non sphérocytaires, héréditaires, ainsi que les anémies atypiques, la porphyrurie érythropoïétique et l'anémie congénitale à corps de Heinz, enfin la thalassémie et les syndromes voisins. Le dernier chapitre concerne les hémoglobinopathies comme la maladie drépanocytaire. Le nombre d'articles d'hématologie publiés sur ce sujet durant ces cinq dernières années a atteint plusieurs milliers et il a été évidemment difficile de mettre à jour un traité en un temps suffisamment court pour permettre une publication rapide. L'auteur a préféré fournir une mise au point sur la première partie de son traité et a reporté la publication de la deuxième partie à une période ultérieure. On trouvera dans cet ouvrage toutes les précisions concernant ces différents domaines, analysés avec une très grande compétence et en tenant compte des différentes opinions admissibles. Tous les principaux auteurs sont cités, et notamment un grand nombre d'auteurs de langue française, et chaque contribution est bien mise en valeur et prend sa juste place. Cet ouvrage aura le même succès que ceux de cette série et contribuera certainement à la progression de nos connaissances en hématologie. Un index de 10 pages complète le volume.

A. E.

G. Causey. — *The cell of Schwann*. 1 vol., 120 p., E. et S. Livingstone, édit., Edimbourg et Londres, 1960. Prix : 21 s.

Cette petite monographie développe les différents aspects de la structure du tronc nerveux et de la fibre nerveuse périphériques ainsi que l'ultrastructure des cellules de Schwann examinées notamment en microscopie électronique et avec des grossissements de 190 000, ou en culture de tissus. La structure de ces cellules a été étudiée à la terminaison nerveuse ainsi qu'au cours des processus de dégénérescence et de régénération.

Enfin un court chapitre concerne les néoplasmes de cette cellule. Ainsi cette petite monographie apportera des précisions sur une formation qui est en général peu connue. A. E.

E. J. Ross. — *Aldosterone in clinical and experimental medicine*. 1 vol., 144 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1959, Prix : 22 s. 6 d.

Dans cette monographie de 120 pages (contenant 539 références) l'auteur entreprend de définir l'aspect expérimental et clinique des études concernant cette hormone isolée assez récemment.

En effet, il semble bien établi que la fonction minéralocorticoïde de la glande surrénale soit assumée par l'aldostérone qui est environ mille fois plus active que la désoxycorticostérone, laquelle a été synthétisée et utilisée depuis de nombreuses années.

Après une bonne introduction historique, suivie de chapitres sur les techniques de dosage et le métabolisme, il y a une bonne étude des propriétés physiologiques de cette hormone singulière. En effet, sa sécrétion semble échapper à tout contrôle hypophysaire et sa régulation se ferait par des centres nerveux diencéphaliques.

La deuxième partie de l'ouvrage est consacrée à l'étude des syndromes cliniques d'hyper- et d'hypo-aldostéronémie et des perspectives de la thérapeutique substitutive. Après quoi, l'auteur conclut en esquissant le rôle éventuel de l'aldostérone dans l'homéostasie. L. C.

The biochemical response to injury. Symposium du Conseil des Organisations Internationales des Sciences Médicales. 1 vol., 467 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960. Prix : 57 s. 6 d.

Cet ouvrage constitue le recueil des communications faites au Symposium International sur les effets métaboliques de l'agression, tenu en Autriche en septembre 1958, immédiatement après le IV^e Congrès International de Biochimie.

Les différents chapitres concernent les réponses locales et générales de l'organisme à la plupart des formes d'agression (hémorragie, ischémie, action des bactéries et de leurs produits, chaleur, froid) à l'exception de l'action des radiations ; ainsi il constitue un résumé de nos connaissances sur ces problèmes. Les côtés pratiques sont examinés et cet ouvrage intéressera directement les médecins et chirurgiens aussi bien que les biochimistes, pathologistes et physiologistes ou bactériologistes. Parmi les différents chapitres, signalons les électrolytes et le glycogène, le métabolisme des composés phosphorés et notamment des

nucléotides dans le tissu traumatisé, par TRÉMOLIÈRES ; l'activation des substances endogènes produisant une augmentation de la perméabilité capillaire par MILES ; les modifications de l'énergie de transformation, les réponses métaboliques à une lésion du tissu cérébral, les lésions tissulaires attribuables à une diminution de la perméabilité érythrocytaire, les troubles du métabolisme des protéines après agression physique ; les troubles des liquides, des électrolytes et des protéines plasmatiques au cours du choc, par J. FINE, et enfin considérations sur le traitement de l'agression. A la fin de chaque chapitre on trouve l'essentiel de la discussion qui a été établie entre les différents participants. Après un chapitre de conclusion, une bibliographie importante, de près de 30 pages, ainsi qu'un index, complètent cet intéressant ouvrage.

A. E.

W. Dalrymple-Champneys. — *Brucella infection and undulant fever in man*. 1 vol., 196 p., Oxford University Press, Londres, 1960. Prix : 25 s.

Il est intéressant de trouver exposé, en un ouvrage relativement bref et sous forme concise, l'essentiel des connaissances acquises dans le domaine de la brucellose humaine. Les matières traitées comprennent : l'historique de la maladie, la description de l'agent étiologique et de ses différentes espèces, le rôle des animaux réservoirs de virus, les modes de transmission des animaux à l'homme, la fréquence et la répartition de l'infection, les formes cliniques, le diagnostic et ses procédés divers, les moyens de prévention, le traitement, le pronostic. Certains aspects épidémiologiques concernent plus particulièrement la Grande-Bretagne, sans perdre pour cela leur intérêt général. La documentation de l'auteur s'appuie sur 1 500 observations personnellement recueillies de 1929 à 1957 et sur une bibliographie qui comprend 390 références. La lecture du livre fait apparaître les progrès successivement réalisés, mais aussi les problèmes qui restent à résoudre.

P. T.

G. Mandahl-Barth. — *Les hôtes intermédiaires de Schistosoma : « Biomphalaria » et « Bulinus » africains*, Genève, 1959 (*Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 37, 138 p.). Dépôt légal pour la France : Librairie Masson, Paris.

La confusion, due à la brièveté des diagnoses et aux variations locales du matériel étudié, régnant jusqu'à ces dernières années dans la systématique des mollusques vecteurs de schistosomias, a amené l'O. M. S. à réunir plusieurs colloques de malacologistes expérimentés « en vue d'établir une nomenclature universellement admise et stable ». Cette monographie basée sur l'étude morphologique et la dissection d'un grand nombre de ces gastéropodes a été faite, ainsi, après examen d'environ 5 500 spécimens appartenant à 794 populations différentes. L'auteur insiste d'abord sur la difficulté de préciser les critères d'espèces car, d'une part les Basommatophores sont capables de se reproduire sans copulation préalable et, d'autre part, les formes d'une même espèce, suivant leur provenance géographique, peuvent se présenter comme des espèces différentes, sous l'influence du milieu, ou s'iden-

tifier étroitement. Une infinité d'espèces furent créées anciennement ; pour leurs spécimens-types nous n'avons qu'une indication sommaire du lieu de leur récolte (défaut grave pour des mollusques présentant des variations locales) et leur diagnose n'est basée que sur la morphologie de la coquille, reconnue actuellement insuffisante et sujette aux modifications dues à l'âge, la nutrition de l'animal et le calcaire de l'eau où il vit.

Ce travail visant donc à mettre entre les mains du chercheur un outil permettant de déterminer ce matériel si important au point de vue médical pour la prophylaxie de la schistosomiase, passe en revue les espèces africaines susceptibles d'être ses hôtes intermédiaires. Dans son premier chapitre consacré au genre *Biomphalaria* Preston, après une description de la coquille, de l'anatomie topographie du mollusque, en particulier de son système digestif et de ses organes génitaux, l'auteur passe en revue les 19 espèces et sous-espèces reconnaissables, qu'il divise en 4 groupes (*pfeifferi*, *choanomphala*, *alexandrina* et *sudanica*) ; parmi elles, il décrit une espèce *B. angulosa* n. sp., et trois sous-espèces *B. pfeifferi rhodesiensis* n. subsp. *B. alexandrina wansoni* n. subsp. *B. camerunensis manzadica* n. subsp.

Le deuxième chapitre, basé sur le même plan, passe en revue le genre *Bulinus* Müller qui est divisé en 20 espèces et 8 sous-espèces formant 4 groupes : *africanus* (sous-genre *Physopsis* Krauss 1848), *tropicus*, *truncatus* et *forskali* (qui appartiennent au sous-genre *Bulinus* str. s.). Une seule espèce décrite dans ce genre : *B. camerunensis* n. sp.

Cet ouvrage est abondamment illustré : 25 figures au trait et 40 planches photographiques qui complètent avantageusement les descriptions données pour chacune des espèces : ainsi conçu il doit rendre de grands services au parasitologue qui y trouvera à la fois documentation et iconographie appropriées. J. C.-B.

Evaluation des bourses d'étude et de perfectionnement, rapport d'un groupe d'étude. *Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 186, 16 pages. Prix : 1/9, \$ 0,30, Fr. s. 1,- -. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

Les Services de Santé en URSS : Rapport rédigé par les participants à un voyage d'étude organisé par l'Organisation mondiale de la Santé. *Organisation mondiale de la Santé : Cahiers de santé publique*, 1960, n° 3, 64 pages. Prix : 3/6, \$ 0,60 ou Fr. s. 2,- -. Publié également en anglais. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

Guide d'Hygiène et de Salubrité dans les transports aériens. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 1960, 57 pages. Prix : Fr. s. 2,- -, 3/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)